UNTERSUCHUNGEN ZUR KINETIK DER OXIDATION VON FETALEM UND ADULTEM HÄMOGLOBIN DURCH FERRICYANID UND IHRE BEEINFLUSSUNG DURCH 2, 3-DIPHOSPHOGLYCERAT

Johann Mittermüller

1979

Dissertations- und Fotodruck ANNELIESE SCHUBERT
Corneliusstraße 21 · 8000 München 5 · Telefon 26 81 77

AUS DER KINDERKLINIK DER
UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Direktor: Professor Dr. med. Klaus Betke

UNTERSUCHUNGEN ZUR KINETIK DER OXIDATION VON FETALEM UND ADULTEM HÄMOGLOBIN DURCH FERRICYANID UND IHRE BEEINFLUSSUNG DURCH 2,3-DIPHOSPHOGLYCERAT

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu
München

vorgelegt von
Johann Mittermüller
aus
Siegertsbrunn

München 1979

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität München

Berichterstatter:	**PD Dr. med. H. Th. Versmold**
Mitberichterstatter:	**Professor Dr. med. K. Betke**
Dekan:	Professor Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 6. November 1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

M E I N E N E L T E R N

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547009_0017

Inhaltsverzeichnis

I.	E i n f ü h r u n g	11
1.1.	Historische Entwicklung	11
1.2.	Das Hämoglobinmolekül	12
1.2.1.	Zusammensetzung	12
1.2.2.	Räumliche Anordnung	12
1.2.2.1.	Primärstruktur	12
1.2.2.2.	Sekundärstruktur	13
1.2.2.3.	Tertiärstruktur	13
1.2.2.4.	Das Häm	14
1.2.2.5.	Quartärstruktur	14
1.2.3.	Physiologisch wichtige Eigenschaften des Hb	15
1.2.3.1.	Kooperativität	16
1.2.3.2.	Bohr-Effekt	16
1.2.3.3.	Wirkung des 2,3-DPG	17
1.2.3.4.	Dimerisation des Hb	17
1.2.4.	Modelle zur Erklärung der Eigenschaften des Hb	17
1.3.	Das stereochemische Modell (Perutz)	18
1.3.1.	Das Geschehen während der Oxygenation	18
1.3.1.1.	Nomenklatur	18
1.3.1.2.	Erklärung der Kooperativität	19
1.3.1.3.	Erklärung der Wirkung von 2,3-DPG	20
1.3.2.	Das Geschehen während der Oxidation	20
1.3.2.1.	Beschreibung des Methämoglobins (MetHb)	20
1.3.2.2.	Erklärung der Kooperativität	21
1.3.2.3.	Erklärung der Wirkung von organischem Phosphat	22
1.3.3.	Kritische Anmerkungen zum stereochemischen Modell	22

1.4.	Fragestellung	24
1.4.1.	Molekular-biologischer Gesichtspunkt	24
1.4.1.1.	Stereochemischer Aspekt	24
1.4.1.2.	Kinetischer Aspekt	24
1.4.1.3.	Gesichtspunkt der Heterogenität der einzelnen Ketten	25
1.4.2.	Klinischer Aspekt	27
II.	M a t e r i a l und M e t h o d e n	28
2.1.	Material	28
2.1.1.	Hb-Lösungen	28
2.1.1.1.	Präparation der HbA_1-Lösung	28
2.1.1.2.	Präparation der HbF_0-Lösung	29
2.1.1.3.	Präparation der HbF_1-Lösung	30
2.1.2.	2,3-Diphosphoglycerat (2,3-DPG)	31
2.1.3.	Kaliumferricyanid ($K_3Fe(CN)_6$, FeCy)	32
2.1.4.	Triäthanolamin-Hydrochlorid-Puffer (TRAP-Puffer)	32
2.1.5.	Kaliumchlorid (KCl)	32
2.1.6.	Äthylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz (EDTA)	32
2.2.	Methoden	33
2.2.1.	Bestimmung der Hb-Konzentration	33
2.2.1.1.	Nach der Methode von Betke und Savelsberg (32)	33
2.2.1.2.	Cyanhämoglobin-Schnellmethode (66,93)	33
2.2.2.	Bestimmung des MetHb-Anteils in den Hb-Lösungen nach der Methode von Evelyn und Malloy (63), Modifikation nach Marti	34
2.2.3.	Polyacrylamid-Elektrophorese zur Überprüfung des Reinheitsgrades der Hb-Lösungen nach Wehinger (161)	34

2.2.4.	Meßmethode	35
2.2.5.	Durchführung der Versuche	36
2.2.5.1.	Herstellen der Versuchsansätze	36
2.2.5.2.	Versuchsbedingungen	36
2.2.5.3.	pH der Versuchsansätze	37
2.2.5.4.	Meßvorgang bei den Versuchen in Luft	37
2.2.5.5.	Meßvorgang bei den Versuchen in O_2-Atmosphäre	37
III.	A u s w e r t u n g	38
3.1.	Behandlung der aufgezeichneten Reaktionsabläufe	38
3.1.1.	Umrechnen der Extinktionsänderungen auf prozentuale Umsätze	38
3.1.2.	Ablesen der Extinktionswerte	38
3.1.3.	Verdünnung durch das Startvolumen	39
3.2.	Graphische Auswertung der Reaktionsabläufe	39
3.3.	Bestimmung der Halbwertszeiten t/2	39
3.4.	Auswertung nach dem 4-Stufen-Modell	40
3.4.1.	Ableitung	40
3.4.2.	Durchführung der Berechnungen	42
3.4.3.	Beurteilung der Angleichungen	43
3.4.4.	Beschreibung des 4-Stufen-Modells	44
3.5.	Kritik der Methoden	44
3.5.1.	Messung bei der Wellenlänge 578 nm	44
3.5.2.	Spektrale Änderungen durch die Zugabe von organischen Phosphaten zu O_2-Hb	45
3.5.3.	Spektral differente Zwischenstufen	45
3.5.4.	Ferricyanid-Konzentration in der Berechnung	46
3.5.5.	Einfluß von Ferrocyanid auf die Oxidationskinetik	47

IV. Ergebnisse

4.1. Versuche bei pO_2 = 140 Torr (Luft) 48
4.1.1. Graphische Auswertung 48
4.1.2. Auswertung nach den Halbwertszeiten t/2 48
4.1.3. Auswertung nach dem 4-Stufen-Modell 49

4.2. Versuche bei pO_2 = 700 Torr (O_2-Atmosphäre) 50
4.2.1. Graphische Auswertung 50
4.2.2. Auswertung nach den Halbwertszeiten t/2 50
4.2.3. Auswertung nach dem 4-Stufen-Modell 51

4.3. Versuche mit einem (FeCy/Häm)-Überschuß von 4,0 (M/M) 53

4.4. Versuche mit EDTA 53

V. Besprechung der Ergebnisse 54

5.1. Die Hb-Oxidation durch Ferricyanid in Abwesenheit von 2,3-DPG 54
5.1.1. Abhängigkeit von physikalisch-chemischen Größen 54
5.1.1.1. O_2-Konzentration 54
5.1.1.2. Ferricyanidkonzentration 55
5.1.2. Abhängigkeit der Hb-Oxidation von intrinsischen Größen des Hb 56
5.1.2.1. Redoxpotential 56
5.1.2.2. O_2-Affinität 57
5.1.3. Unterschied zwischen der Hb-Oxidation durch Ferricyanid und der Autoxidation 61

5.2.	Hb-Oxidation durch Ferricyanid in Gegenwart von 2,3-DPG	62
5.2.1.	Einfluß des 2,3-DPG auf die Halbwertszeit (t/2)	62
5.2.2.	Bindungsunterschiede von 2,3-DPG an verschiedene Hb-Typen und partielle Methämoglobine	63
5.2.3.	Einfluß unterschiedlicher Ionenstärken in den Reaktionsansätzen	64
5.2.4.	Oxidationsablauf in Gegenwart von 2,3-DPG	65
5.2.5.	Sigmoider Oxidationsverlauf bei pO_2 = 700 Torr	66
5.2.6.	2,3-DPG-Effekt auf die einzelnen Ketten (Perutz-Modell)	67
5.2.7.	Propagation konformationeller Änderungen zwischen den Untereinheiten	67
5.2.8.	Einfluß des Redoxpotentials in Gegenwart von 2,3-DPG	68
5.3.	Gleichartiger 2,3-DPG-Effekt auf die Ferricyanidoxidation von O_2HbA_1 und O_2HbF_o	69
5.4.	Klinische Bedeutung der Ergebnisse	71
VI.	Zusammenfassung	74
VII.	Literaturverzeichnis	79
VIII.	Abbildungen	95
IX.	Tabellen	122
	Danksagung	125
	Lebenslauf	126

Die in dieser Arbeit dargestellten Untersuchungen befassen sich mit dem schon seit langem ausführlich behandelten Problem der Umwandlung des physiologisch funktionstüchtigen Hämoglobins zum Methämoglobin, das am O_2-Transport nicht mehr teilnimmt.

Die alte, bereits 1952 von Betke aufgeworfene Frage, ob die O_2-Affinität des Hämoglobins auf das Hämoglobin/Methämoglobin-Gleichgewicht einen Einfluß haben könnte, ist von klinischem und auch molekular-biologischem Interesse.

Unter einem neuen Gesichtspunkt, nämlich der Rolle allosterischer Effektoren des Hämoglobinmoleküls wurde diese Frage wieder aufgegriffen.

I. Einführung

1.1. Historische Entwicklung

Schon vor 1857 fand Schmidt in den roten Blutkörperchen grössere Mengen an Phosphaten (144). Greenwald zeigte, daß sich die hohe Phosphatkonzentration in Schweine-Erythrocyten auf das D-2,3-Diphosphoglycerat (2,3-DPG) zurückführen ließ (73). Rapoport u. Guest weiteten die Gültigkeit dieser Aussage noch auf andere Species einschließlich des Menschen aus (134).

Die Bedeutung dieser hohen intraerythrocytären 2,3-DPG-Konzentration (4,83 ± 0,15 mM (62)) blieb jedoch lange unklar. Adair vermutete 1921 irgendeine in Hämoglobinlösungen vorhandene, dritte Substanz, die einen integralen Teil des " Sauerstoff-Hämoglobin-Komplexes " bilden sollte (3). Erst 1967 entdeckten Benesch und Benesch (25), sowie Chanutin und Curnish (52), daß 2,3-DPG in vitro die O_2-Affinität des Hämoglobins (Hb) vermindert und damit eine physiologische Bedeutung für die O_2-Versorgung der Gewebe haben sollte.

Tatsächlich wurde 1972 von Versmold et al. am intakten Organ eine Verbesserung der mitochondrialen O_2-Versorgung nach Zugabe von 2,3-DPG zum Perfusat gemessen (155,159).

Bis heute nun hat sich viel Literatur angesammelt, die sich mit der Beziehung zwischen organischen Phosphaten (z.B. 2,3-DPG) und dem Hb-Molekül befassen, zumal das 2,3-DPG als allosterischer Effektor einmal mehr die Möglichkeit bietet, zu einem besseren Verständnis der Struktur-Funktions-Beziehung biologischer Moleküle zu gelangen.
Der derzeitige Stand der Ergebnisse soll im folgenden umrissen werden.

1.2. Das Hämoglobinmolekül

1.2.1. Zusammensetzung

Der rote Blutfarbstoff des Erwachsenen (HbA) hat ein Molekulargewicht von etwa 64400, und setzt sich aus einem Proteinanteil, dem Globin, und vier prosthetischen Gruppen, den Hämen, zusammen. Der Globinanteil besteht aus vier Polypeptidketten, von denen je zwei identisch sind, den α-Ketten (α_1, α_2) mit je 141 Aminosäuren, und den ß-Ketten ($ß_1$,$ß_2$) mit je 146 Aminosäuren. Das fetale Hb (HbF) besitzt an Stelle der ß-Ketten zwei identische γ-Ketten (γ_1,γ_2) mit je 146 Aminosäuren. Eine Peptidkette bildet zusammen mit einem Häm jeweils eine der vier Untereinheiten des Hb-Moleküls.

1.2.2. Räumliche Anordnung

1.2.2.1. Primärstruktur

Für das HbA wurde die Reihenfolge der Aminosäuren der einzelnen Ketten 1961 von Braunitzer und Mitarbeitern aufgeklärt. Trotz ähnlicher Sequenzen in allen Bereichen befinden sich nur 64 Aminosäuren in identischen Positionen. Die Reihenfolge der Aminosäuren ist genetisch festgelegt. Die Veränderung der Aminosäuresequenz durch den Austausch von Aminosäuren durch andere, oder durch die chemische Modifikation von Aminosäureresten führt zu verschiedenen Hb-Typen.

Physiologische Hämoglobintypen

Das HbA läßt sich in HbA_1 ($\alpha_2ß_2$), HbA_2 ($\alpha_2\delta_2$) und HbA_{Ic} ($\alpha_2ß_2^{1\text{Val-Hexose}}$), das HbF in HbF_o ($\alpha_2\gamma_2^{145\text{Ser}}$) und HbF_1 ($\alpha_2\gamma_2^{145\text{Ser};1\text{Val-acetyl}}$) unterteilen.

Daneben gibt es noch eine Vielzahl mehr oder weniger pathologischer Hb-Varianten, deren Eigenschaften Rückschlüße auf die Funktion der ausgetauschten Aminosäure und so detailiertere Aussagen über das Hb erlauben.

1.2.2.2. Sekundärstruktur

Die räumliche Anordnung einer Peptidkette zu einem stabilen Gebilde nennt man Sekundärstruktur.

Eine einzelne Kette bildet größtenteils rechtsgängige Spiralen mit einer Identidätsperiode von 3,7 Aminosäuren pro Windung, die man α-Helices nennt. Die Helices werden in sich durch H-Brückenbindungen stabilisiert, die polaren Gruppen der Aminosäuren sind nach außen gerichtet und dienen der Löslichkeit. Es sind 70 % der Aminosäuren in 8 Helixabschnitten untergebracht, die man mit den Buchstaben A,B,C...H vom N-terminalen Aminosäurenende her bezeichnet.

1.2.2.3. Tertiärstruktur

Die Tertiärstruktur bedeutet die räumliche Anordnung der Peptidkette mit ihren einzlenen Helices zu einer thermodynamisch günstigen Form.

Sie scheint durch die Aminosäuresequenz festgelegt zu sein, da z.B. Prolin keine H-Brücke bilden kann und so zu einem Helixabbruch führt. Sulfidbrücken, polare Bindungen zwischen sauren und basischen Gruppen, und hydrophobe Wechselwirkungen stabilisieren sie. In einer hydrophoben Tasche zwischen E- und F-Helix befindet sich die prosthetische Gruppe, welche Häm oder Ferroprotoporphyrin IXa genannt wird.

1.2.2.4. Das Häm

Die Häm-Gruppe ist für alle Untereinheiten im Gegensatz zum Globin gleich:

Vier Pyrrolringe, durch Methin-Gruppen (-CH_2=) verknüpft, bilden ein ebenes Ringsystem, in dessen Mitte ein zweiwertiges Fe-Ion sitzt und an die N-Atome der vier Pyrrolringe gebunden ist. Nur über die 5. Koordinationsstelle des Fe-Ions ist das Häm kovalent an das His F8(92)ß, bzw. His F8 (87)α des Globins (proximales Histidin) gebunden. Auf der anderen Seite des Häms befindet sich zwischen dem distalen Histidin der E-Helix (His E7(58)α, His E7(63)ß) und dem Porphyrinring genügend Raum, um die reversible exotherme Bindung von Sauerstoff oder anderen Liganden an die 6. Koordinationsstelle des Fe-Ions zu ermöglichen. 60 Atom-Kontakte (Abstand < 4Å) verankern den Porphyrinring noch zusätzlich im umgebenden Globin (126,127). Die streng hydrophobe Umgebung des Häms gewährleistet die Zweiwertigkeit des Eisens, das in wässriger Lösung sehr schnell zum dreiwertigen Eisen mit dem Verlust der Sauerstoffbindung oxidieren würde.

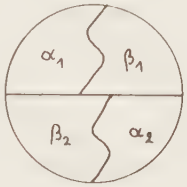
Das Hb mit dem dreiwertigen Eisen wird Methämoglobin (MetHb), Hämiglobin oder Ferrihämoglobin genannt; es wird in vivo durch ein Enzymsystem und in vitro durch Dithionit zum voll funktionstüchtigen Hb reduziert.

1.2.2.5. Quartärstruktur

Die Anordnung der vier Untereinheiten zu einem Hb-Molekül bezeichnet man als Quartärstruktur.

Sie ist durch heteropolare Bindungen (Salzbrücken), H-Brükken und apolare Wechselwirkungen stabilisiert. Die vier Untereinheiten sind so angeordnet, daß ihre Hämgruppen an den

Ecken eines irregulären Tetraeders sitzen. Dabei bewirkt die komplementäre Struktur der nicht identischen Untereinheiten einen engeren Kontakt zwischen diesen ($\alpha_1\beta_1$-, und $\alpha_1\beta_2$-Kontakt) als zwischen identischen Untereinheiten $\alpha_1\alpha_2$-, und $\beta_1\beta_2$-Kontakt). Am $\alpha_1\beta_1$-Kontakt (Oxykonformation) sind 34 Aminosäuren mit 110 Atomen beteiligt, am funtionell wichtigeren $\alpha_1\beta_2$-Kontakt (Oxykonformation) 19 Aminosäuren mit 80 Atomen (Deoxykonformation: $\alpha_1\beta_1$: 32 Aminosäuren mit 98 Atomen, $\alpha_1\beta_2$: 20 Aminosäuren mit 69 Atomen)(6,41,127).



Weitere Daten des HbA-Moleküls sind in folgender Tabelle aufgeführt:

Molekulargewicht	64450 ohne Hydrathülle
	68000 mit Hydrathülle
Fe-Gehalt	0,35 Gewichts-%
Zahl der Aminosäuren	574
Größe	64 x 55 x 50 Å

1.2.3. Physiologisch wichtige Eigenschaften des Hb

Nur Hämoglobine, bei denen die Kontakte nicht identischer Ketten nicht gestört sind, zeigen die drei wichtigen funktionellen Phänomene, mit denen das Hb zur O_2-Versorgung der Gewebe beiträgt; das sind

1) die kooperative Ligandenbindung
2) der Bohr-Effekt
3) die Abhängigkeit der Sauerstoffaffinität von organischem Phosphat (2,3-DPG).

1.2.3.1. Kooperativität

Kooperativität oder Häm-Häm-Wechselwirkung bezeichnet die Tatsache, daß der vorausgehende Reaktionsschritt den nachfolgenden begünstigt; das bedeutet bei der O_2-Beladung des Hb-Moleküls, daß die Anlagerung des ersten O_2-Moleküls am schwierigsten ist und zugleich die Anlagerung des zweiten O_2-Moleküls erleichtert, u.s.w. ("heme-heme-interaction"). Daraus resultiert die sigmoide Form der O_2-Sättigungskurve.

Hill'scher Exponent

Als Maß zur Beurteilung der Kooperativität dient allgemein der Wert des Hill'schen Exponenten n aus der empirisch, 1910 von Hill gefundenen Gleichung $y = (Kp^n)/(1 + Kp^n)$, wobei y die O_2-Sättigung, p die O_2-Konzentration und K sowie n Konstanten darstellen (54). Sie beschreibt den Sättigungsverlauf der Oxygenation im Bereich 10% - 90% zufriedenstellend (140). Bei n=1 fehlt Kooperativität, die Sättigung des Hb erfolgt statistisch. HbA hat zwischen pH 6 und pH 9 einen Hill'schen Exponenten von ca. 2,7 (64,140).

1.2.3.2. Bohr-Effekt

Der Bohr-Effekt (40) beschreibt die Verschiebung der O_2-Sättigungskurve zu niedrigen Partialdrucken bei steigendem pH; ihre sigmoide Form bleibt erhalten. Als alkalischen Bohr-Effekt bezeichnet man auch die Tatsache, daß oberhalb von pH 6,5 bei der Anlagerung eines Liganden an das Hb Protonen in Lösung gehen, d.h. O_2-entladenes Hb (Desoxyhämoglobin, DHb) bindet mehr Protonen als O_2-beladenes Hb (Oxyhämoglobin, O_2Hb), es puffert. Seine Pufferfunktion als Molekül für den CO_2-Transport soll hier nicht besprochen werden (Übersicht bei Bauer (21)).

1.2.3.3. Wirkung des 2,3-DPG

Die 2,3-DPG-Konzentration im Erythrocyten wird durch den pH bestimmt, und liegt in etwa äquimolarem Verhältnis zum Hb vor (Übersicht bei J.Duhm (59)). 2,3-DPG vermindert die O_2-Affinität des Hb und erleichtert dadurch die Abgabe des Sauerstoffs an das Gewebe.

Diese Verminderung der O_2-Affinität läßt sich auch durch eine 2000mal größere Konzentration an NaCl erreichen (27); steigende Salzkonzentration vermindert den Bohr-Effekt - es gehen weniger Protonen in Lösung (7) -, und steigert die Kooperativität der Ligandenbindung (139).

1.2.3.4. Dimerisation des Hb

Das Hb-Tetramer (Hb_4) vermag in seine Untereinheiten zu zerfallen; es bilden sich zuerst Dimere, dann Monomere: $\alpha_2\beta_2 \rightleftharpoons 2\alpha\beta \rightleftharpoons 2\alpha + 2\beta$ (74,75,151). Sinkende Hb-Konzentration, sinkender pH unterhalb pH 6,5, steigende Ionenstärke, steigende Temperatur und Ligandenbindung verschieben das Tetramer/Dimer-Gleichgewicht in Richtung Dimere (22,60,76,81,149). Die isolierten Untereinheiten besitzen andere physikalische und chemische Eigenschaften als im tetrameren Verband (10,117, 118,143).

1.2.4. Modelle zur Erklärung der Eigenschaften des Hb

Um die verschiedenen Eigenschaften des Hb-Moleküls erklären zu können, wurden mehrere Modelle vorgeschlagen:

Die Zwischenbindungshypothese von Adair (4), das allosterische Modell von Monod, Wyman und Changeux (115), der Austausch von Untereinheiten von Benesch,Benesch, Macduff und Tyuma (23,24), das " induced fit model " von Koshland, Némethy und Filmer

(102), die Dimerhypothese von Antonini (11), die Koordinationshypothese von Barnikol und Thews (15,16), und das stereochemische Modell von Perutz (128).

Keines dieser Modelle beschreibt alle Eigenschaften des Hb. Letzteres vermag sie jedoch sehr gut und auch anschaulich zu erklären. Es soll im folgenden skizziert werden.

1.3. Das stereochemische Modell (Perutz)

1.3.1. Das Geschehen während der Oxygenation

1.3.1.1. Nomenklatur

Das mit Sauerstoff beladene Hb-Molekül kristallisiert in der Oxystruktur oder Oxykonformation, die sich von der Desoxykonformation des O_2-entladenen Hb-Moleküls sowohl in ihrer Tertiärstruktur (räumliche Anordnung der Untereinheiten selbst), als auch in ihrer Quartärstruktur (räumliche Anordnung der vier Untereinheiten zueinander) unterscheidet.

Will man die Unterschiede allein in ihrer Quartärstruktur hervorheben, so spricht man von R-Zustand oder R-state (Oxykonformation) und von T-Zustand oder T-state (Desoxykonformation). Zur Benennung der Unterschiede nur in ihrer Tertiärstruktur hat man die entsprechenden kleinen Buchstaben r und t eingeführt. Die Buchstaben R und T sind aus dem allosterischen Modell von Monod, Wyman und Changeux (115) übernommen und beschreiben dort das Hb-Molekül nur im Zustand hoher Ligandenaffinität (R, Ligand z.B. O_2) und geringer Ligandenaffinität (T).

1.3.1.2. Erklärung der Kooperativität

Im Desoxyzustand liegt das 5-koordinierte Eisenatom etwa 0,75 Å außerhalb der Hämebene in Richtung des proximalen Histidins, da seine Elektronenwolke zu groß ist (high spin), um in den Porphyrinring hineinzupassen. Bei der Bindung eines Liganden (z.B. O_2) schrumpft das Eisenatom (→low spin), so daß es in die Hämebene hineinrutschen kann. Der hierdurch bedingte Zug am proximalen Histidin verursacht eine nachfolgende Strukturänderung der gesamten, betroffenen Untereinheit (t→r). Nach einem oder mehreren t→r-Übergängen im Verlauf der Oxygenation erfolgt eine Änderung der Quartärstruktur, die in einem Zusammenrücken der Fe-Atome der ß Ketten (um 6,5 Å), einem Auseinanderrücken der Fe-Atome der α Ketten (um 1,0 Å) und einer zusätzlichen Verdrehung der α Ketten gegen die ß Ketten besteht (T→R). Dies wird ermöglicht durch das Aufbrechen heteropolarer Bindungen ("Salzbrücken"), die die Desoxystruktur stabilisieren:

zwischen den Untereinheiten	Lys H10(127)α_1-NH_3^+	.....$^-$OOC-Arg HC3(141)α_2
	Asp H 9(126)α_1-COO^-	.....$^+$Gua-Arg HC3(141)α_2
	Lys C 5(40)α_1-NH_3^+	.....$^-$OOC-His HC3(146)$ß_2$
innerhalb einer Untereinheit	His HC3(146)$ß_1$-Im^+	.....$^-$OOC-Asp FG1(94)$ß_1$
	Tyr HC2(145)$ß_1$-OH	------ OC-Val FG5(98)$ß_1$
	Tyr HC2(140)α_1-OH	------ OC-Val FG5(93)α_1

Dieser quarternäre T→R-Übergang erleichtert die tertiären t→r-Übergänge der restlichen Untereinheiten in t-Struktur, d.h. die Aktivierungsenergie zum t→r-Übergang wird geringer; daraus folgt eine erhöhte Ligandenaffinität für diese Untereinheit und somit Kooperativität für die Gesamtreaktion.

Der Gedanke, daß der variierende Abstand zwischen dem Hämeisen und der Hämebene die Tertiär- und Quartärstruktur des Hb bestimmt, wurde bereits 1966 von Hoard et al. (84) geäußert.

1.3.1.3. Erklärung der Wirkung von 2,3-DPG

2,3-DPG ist bei einem physiologischen pH durchschnittlich 3,3-fach negativ geladen und wird heteropolar in die zentrale Höhlung des Hb-Moleküls zwischen die Carboxyl- und Aminoenden der ß Ketten gebunden (13,128). Die Bindungsstellen sind: Val NA1(1)-NH_3^+, His NA2(2)-Im^+, Lys EF6(82)-NH_3^+, und His H21 (143)-Im^+. In der Desoxykonformation paßt das 2,3-DPG sterisch genau zwischen diese Aminosäurereste und stabilisiert so die T-Struktur; das R⇌T-Gleichgewicht ist in Richtung T verschoben, es zeigt sich eine verminderte O_2-Affinität des Hb.

Bei der Oxygenation verengt sich die zentrale Höhlung und die C- und N-Termini der ß Ketten rücken auseinander, so daß das 2,3-DPG-Molekül ausgestoßen wird (128). Dieses Ausstoßen des 2,3-DPG-Moleküls ist jedoch nicht Voraussetzung eines quarternären Übergangs in R bei der Oxygenation in Gegenwart von 2,3-DPG (29)(siehe Punkt 5.2.2., S.63).

1.3.2. Das Geschehen während der Oxidation

1.3.2.1. Beschreibung des Methämoglobins (MetHb)

Kooperativität tritt nicht nur bei Oxygenation, sondern auch bei der Oxidation des Hb zu MetHb auf. Die Kooperativität nimmt im Gegensatz zur Oxygenation mit steigendem pH zu (n = 1,3 bei pH 6,5 bis n = 2,5 bei pH 8,4 (8)). Organisches Phosphat verhindert Kooperativität bei der Oxidation im Sauren (n≤1) und läßt sie im Alkalischen unbeeinflußt (n=2,7)(98).

Das MetHb ist stets heteropolar ligandiert und kristallisiert in der Oxykonformation (130). Sein dreiwertiges Eisen überragt die Hämebene um ca. 0,3 Å in Richtung des proximalen Histidins (41,128). Der jeweilige Ligand bestimmt neben der artspezifischen Proteinkomponente den spin-Zustand des Eisens (39):

Fluoromethämoglobin (F^-MetHb) wird als reine high spin-Verbindung (μ_{eff}=5,9 B.M.), Cyanomethämoglobin (CN^-MetHb) als reiner low spin-Komplex (μ_{eff}= 2,3 B.M.) angesehen. Aquomethämoglobin (H_2OMetHb, μ_{eff}= 5,77 B.M.) und Hydroxymethämoglobin (OH^-MetHb, μ_{eff}= 4,77 B.M.) sind Mischungen aus high spin und low spin, wobei OH^-MetHb den größeren low spin-Anteil hat (12).

Ebenso wie das zweiwertge Hb vermag auch das MetHb organisches Phosphat in einem molaren Verhältnis von 1/1 bei pH 7 zu binden (53,105,123). Die Elektronenwolke des dreiwertigen high spin-Eisens ist kleiner als die des zweiwertigen high spin-Eisens(125).

1.3.2.2. Erklärung der Kooperativität

Der"Zwischenaufenthalt"des Häm-Eisens zwischen R- (Fe in der Hämebene) und T-Zustand (Fe 0,75 Å aus der Hämebene) befähigt das MetHb zum Übergang zwischen Oxy- und Desoxykonformation (129,130,131,132). Der high spin-Anteil im H_2OMetHb begünstigt hierbei einen Übergang in die T-Struktur und führt zu einer Verminderung der Hb-Moleküle im R-state. Die sich hieraus ergebenden geringeren T→R-Übergänge bei der Oxidation des Hb vermindert die Kooperativität auf n = 1,3 (bei pH 6,5).

Der im Alkalischen zunehmende low spin-Charakter im OH^-MetHb gegenüber dem H_2OMetHb begünstigt die R-Konformation, so daß die Konzentration der Hb-Moleküle im T-state zu vernachlässigen ist; infolge eines vollständigen T→R-Übergangs bei der Hb-Oxidation steigt n auf 2,5 (pH 8,4) (Verhalten wie bei der Oxygenation).

1.3.2.3. Erklärung der Wirkung von organischem Phosphat

In Gegenwart von Inositolhexaphosphat (IHP) bei pH 6,5 (n ≈ 1) fehlt eine Kooperativität bei der Hb-Oxidation. Dies erklärt sich aus der Verschiebung des R⇌T-Gleichgewichtes im MetHb nach T durch IHP; es finden also bei der Oxidation keine T→R-Übergänge mehr statt.

Im Alkalischen wird IHP wegen seiner geänderten negativen Ladung kaum mehr gebunden (98); die Kooperativität bleibt deshalb unbeeinflußt.

1.3.3. Kritische Anmerkungen zum stereochemischen Modell

Die Häm-Häm-Wechselwirkung ausschließlich auf heteropolare Bindungskräfte zurückzuführen, läßt sich nicht in Übereinstimmung bringen mit den Befunden von Rossi-Fanelli und Mitarbeitern (139), die auch bei hohen Salzkonzentrationen einen Hill'schen Exponenten von etwa 3 angeben. Die hohe Salzkonzentration müßte zu einer Lockerung der heteropolaren Bindungen und so zu einer verminderten Kooperativität führen.

Daß allein der spin-Zustand des Eisens, also der Fe-Porphyrinring-Abstand, der Trigger für den R→T-Übergang und damit grundlegend für die Funktion des Hb ist, widerspricht neueren Befunden über die Struktur von Kohlenmonoxid-Hb (79), CN^-MetHb (56), F^-MetHb (57) und Mangan-substituiertem MetHb (114) (zentrales Fe-Atom gegen ein Mangan-Atom ausgetauscht).

Sie zeigen nämlich deutlich, daß für die Funktion des Hb zusätzlich auch noch bedeutend sind die Beschaffenheit der Häm-Tasche, die Ligandengröße, und Zwischenwirkungen zwischen Ligand u. jeweiligem Globin und zwischen Porphyrinring u. Globin. Hierauf weisen auch Untersuchungen über die funktionellen Eigenschaften von Hämoglobinen hin, deren Häme chemisch, d.h. sterisch modifiziert sind (146). Gegen eine strenge Abhängigkeit der Kooperativität vom spin-Zustand des zentralen Eisenatoms sprechen weiterhin (a) die Redoxreaktionen von Mangan-substituiertem Hb (46) und F^-MetHb (47), die dieselbe pH-abhängige Kooperativität zeigen wie HbA, sich hierbei jedoch immer im high spin-Zustand befinden, und (b) die kooperative O_2-Bindung von Kobalt-substituiertem Hb (Hill-n von 2,3; 2,3-DPG-Effekt auf p_{50} etwa 3), das bei Oxygenation jedoch immer im low spin-Zustand bleibt (58,85,104,165).

1.4. Fragestellung

1.4.1. Molekular-biologischer Gesichtspunkt

1.4.1.1. Stereochemischer Aspekt

Unter dem Gesichtspunkt oben erwähnter Vorstellung sollte die Oxidation von ligandiertem Hb (z.B. O_2Hb, R-state) durch Ferricyanid nach Zugabe eines allosterischen Effektors bei pH 6,95 beschleunigt werden, da das 2,3-DPG das R⇌T-Gleichgewicht des H_2OMetHb und des O_2Hb zu Gunsten der reaktionsfreudigeren T-Form verschiebt.

1.4.1.2. Kinetischer Aspekt

Kinetisch gesehen setzt sich die Oxidation von ligandiertem Hb durch Ferricyanid aus drei Teilreaktionen zusammen:

1) Abdissoziation des O_2vom O_2Hb ($O_2Hb \xrightarrow{k_d} O_2 + DHb$),
2) Assoziation des O_2 an das DHb ($DHb + O_2 \xrightarrow{k_a} O_2Hb$),
3) Anstatt 2) kann das in 1) entstandene DHb auch zum MetHb oxidiert werden ($DHb + Fe(CN)_6^{3-} \xrightarrow{k_o} MetHb + Fe(CN)_6^{4-}$).

Summenmäßig läßt sich dies wie folgt formulieren:

Schema I

$$(I)\quad O_2Hb \underset{k_a}{\overset{k_d}{\rightleftharpoons}} O_2 + \left\{\begin{matrix} DHb \\ DHb \end{matrix}\right\} \quad (II) \quad + Fe(CN)_6^{3-} \xrightarrow{k_o} MetHb + Fe(CN)_6^{4-}$$

Es ist also der eigentlichen Oxidation (k_o) eine echte Gleichgewichtsreaktion mit der Gleichgewichtskonstanten $K = k_d/k_a$ vorgelagert. Die Geschwindigkeit, mit der das O_2Hb verschwindet, ist von der Lage dieses Gleichgewichtes abhängig, das sich entsprechend der Oxidation von DHb (k_o) fortlaufend verschiebt.

Da eine steigende O_2-Konzentration das Gleichgewicht in (I) nach links verlagert, sollte sich allgemein bei der Hb-Oxidation bei pO_2=700 Torr eine langsamere Oxidationsgeschwindigkeit ergeben als bei pO_2=140 Torr. Die Oxidationsgeschwindigkeit sollte auch (in Abwesenheit von 2,3-DPG) in der Reihenfolge $HbF_1 > HbF_o > HbA_1$ abnehmen, weil in derselben Reihenfolge das Gleichgewicht in (I) immer mehr nach links verschoben ist (p_{50}).

Es sollte die Hb-Oxidation durch 2,3-DPG beschleunigt werden, da 2,3-DPG das Gleichgewicht in (I) nach rechts verschiebt. Wird 2,3-DPG jedoch nicht an das Hb gebunden (HbF_1), so sollte sich keine Oxidationsbeschleunigung ergeben. Aus gegenüber den 2,3-DPG-Effekten auf den p_{50} unterschiedlichen 2,3-DPG-Effekten auf die Ferricyanidoxidation von HbA_1 und HbF_o kann auf einen etwaigen Einfluß des Ferricyanids, bzw. des sich aus ihm bildenden Ferrocyanids auf die 2,3-DPG-Bindung schließen.

1.4.1.3. Gesichtspunkt der Heterogenität der einzelnen Ketten

O_2-Affinität:

Einerseits zeigen nach den umfangreichen Befunden von Gibson und Olson (50,119,120,121,122) die α Ketten im volligandierten und teilligandierten Hb eine größere Ligandenaffinität als die ß Ketten. Da HbA_1, HbF_o und HbF_1 identische α Ketten besitzen, sollte sich die Abnahme der O_2-Affinität in der Reihenfolge $HbA_1 > HbF_o > HbF_1$ auf die Anwesenheit der Nicht-α-Ketten beziehen. Daraus sollte sich dann bei der Oxidation von ligandiertem HbA_1, HbF_o und HbF_1 durch Ferricyanid eine Oxidationsbeschleunigung von HbF_o und HbF_1 gegenüber HbA_1 in erster Linie auf deren Unterschiede in der ersten Hälfte der Oxidation auswirken, die der Oxidation der Nicht-α-Ketten entspräche.

In der zweiten Hälfte der Oxidation sollten sich die Oxidationsgeschwindigkeiten von HbF_o und HbF_1 nicht mehr deutlich von der des HbA_1 unterscheiden (identische α-Ketten).

Redoxpotential:

Andererseits ist nach den Befunden über die unterschiedlichen Redoxpotentiale der einzelnen Ketten und Hb-Tetramere (2,14, 98,105,106), auf die später näher eingegangen wird, ein der O_2-Affinität entgegengesetztes Verhalten bei der Hb-Oxidation durch Ferricyanid zu erwarten, das sich äußern müßte in

1) einer bevorzugten Oxidation der α-Ketten, wie es für die Autoxidation beschrieben wurde (111),
2) in einer verminderten Oxidationsgeschwindigkeit des HbF gegenüber HbA in Anwesenheit von 2,3-DPG
3) in einer Verminderung der Oxidationsgeschwindigkeit von HbA und HbF_o durch 2,3-DPG.

Um das Geschehen während der Oxidation exakter beschreiben zu können, werden die Reaktionsabläufe entsprechend den vier Untereinheiten des Hb nach einem 4-Stufen-Modell analysiert (siehe Auswertung, S.40).

Die Ergebnisse aus den vorliegenden Untersuchungen über die Oxidation von HbA_1, HbF_o und HbF_1 durch Ferricyanid in Gegenwart und Abwesenheit von 2,3-DPG bei pO_2= 140 Torr und pO_2= 700 Torr werden zeigen, daß

1) die Oxidationsgeschwindigkeit mehr von der O_2-Affinität der Untereinheiten als vom Redoxpotential abhängt,
2) die Ferricyanidoxidation nicht identisch ist mit der Autoxidation (keine vorrangige Oxidation der α-Ketten und ein durch das Ferricyanid veränderter 2,3-DPG-Effekt)
3) die Wirkung des 2,3-DPG auf die Oxidationsvorgänge mit dem von Perutz vorgelegten Modell zu erklären sind.

1.4.2. Klinischer Aspekt

Die Oxidationskinetik vom Hämoglobin zum Methämoglobin, mit anderen Worten das Gleichgewicht zwischen diesen beiden Substanzen, ist insofern von praktischer Bedeutung, als unter normalen Umständen im Erythrocyten eine stetige, spontane Bildung von Methämoglobin erfolgt (133), das dann enzymatisch zum zweiwertigen Hämoglobin rückreduziert wird (89).

Wenn allosterische Effektoren, die im Erythrocyten in äquimolaren Konzentrationen zum Hämoglobin vorliegen, die Methämoglobinbildung signifikant beschleunigen, so wäre theoretisch ein Einfluß auf die steady-state-Konzentration des Methämoglobins im Erythrocyten, und damit auf die O_2-Transportfunktion des Blutes denkbar.

II. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Hb-Lösungen

Zur Durchführung der Versuche werden 2,3-DPG-freie Hb-Lösungen von 640 mg% und pH 6,95 benötigt.

Alle länger dauernden Arbeitsschritte wie Dialyse, Chromatographie und O_2-Druck-Ultrafiltration wurden in reiner O_2-Atmosphäre bei 4 °C durchgeführt.

Nach der Chromatographie werden die gereinigten Hb-Lösungen gegen einen 0,05 M Triäthanolamin-Hydrochlorid-Puffer (TRAP-Puffer) pH 6,95 mindestens 16 Stdn. dialysiert; mittels O_2-Druck-Ultrafiltration werden sie auf 640 mg% eingestellt.

2.1.1.1. Präparation der HbA_1-Lösung

Die HbA_1-Lösung wird aus dem Blut einer Erwachsenenblutkonserve mit ACD-Puffer hergestellt. Das Vollblut wird zweimal mit einer 0,9 %-igen NaCl-Lösung gewaschen. Die abzentrifugierten Erythrocyten werden durch Hinzufügen der doppelten bis dreifachen Menge Aqua dest. hämolysiert. Die Membranen werden abzentrifugiert (20 Min. bei 5000 U/Min.). Der Hb-haltige Überstand wird zur Entfernung verbliebender Lipide mit dem doppelten Volumen CCl_4 ausgeschüttelt. Anschließend wird gegen einen 0,05 M Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-Puffer (TRIS-HCl-Puffer) pH 8,5 bei 4 °C dialysiert, bis ein pH von 8,3 erreicht ist.

Chromatographische Abtrennung des 2,3-DPG und des HbA_2:

2,9 g der Hb-Lösung werden auf eine Chromatographiesäule (Ø 5,5 cm, l = 20 cm) mit DEAE Sephadex A50, particle size 40-120 µ (PHARMACIA, Uppsala), die mit einem 0,05 M TRIS-HCl-Puffer pH 8,3 äquilibriert ist, aufgetragen. Es wird mit 150 ml 0,05 M TRIS-HCl-Puffer pH 8,3 nachgewaschen (1 Tropfen pro 11 Sek.). Ein kleiner Anteil des aufgetragenen Hb beginnt sofort zu wandern. Es wird dann ein steiler Puffer-Gradient von pH 8,3 ⟶ pH 6,5 (0,05 M TRIS-HCl-Puffer) angeschlossen. Dialyse und Einstellung der Hb-Konzentration des abgetrennten HbA_1 wie unter 2.1.1. beschrieben.

Der MetHb-Anteil der entgültigen HbA_1-Lösung betrug maximal 2,1 %. Mittels Polyacrylamid-Elektrophorese nach Wehinger (161) wurde die Reinheit der HbA_1-Lösung überprüft. Es war keine Verunreinigung durch HbA_2 festzustellen (Abb.1).

2.1.1.2. Präparation der HbF_o-Lösung

Die HbF_o-Lösung wird aus einem Citrat-Nabelschnurblut hergestellt. Die Arbeitsschritte bis zum Auftragen des Hb auf die Chromatographiesäule entsprechen denen bei HbA_1 (Pkt.2.1.1.1.). Hämolysiert wird jedoch durch zweimaliges Gefrieren und Tauen.

Chromatographische Abtrennung von HbA_1, HbF_1 und 2,3-DPG:

Auf eine Säule (Ø 3 cm, DEAE Sephadex A50, 60 cm hoch, äquilibriert mit 0,05 M TRIS-HCl-Puffer, pH 8,4) werden 2,9 g Nabelschnur-Hb aufgetragen. Es wird eine Stunde mit 0,05 M TRIS-HCl-Puffer pH 8,4 nachgewaschen (1 Tropfen pro 9 Sek.), dann mit einem 0,05 M TRIS-HCl-Puffer-Gradienten von pH 8,2 → pH 7,9, je 700 ml, eluiert, an den ein weiterer Puffer-Gradient von pH 7,9 ⟶ pH 7,6, je 500 ml TRIS-HCl-Puffer, anschließt.

Die Chromatographie wird soweit entwickelt, bis HbA_1, HbF_o und HbF_1 eindeutig getrennt sind. Dann wird der mittlere Anteil der zweiten, größten Bande (HbF_o) aus dem Harz ausgegraben, und hiervon das HbF_o mit einem 0,05 M TRIS-HCl-Puffer pH 6,5 aus dem DEAE Sephadex eluiert. Dialyse und Einstellung der Hb-Konzentration der gewonnenen HbF_o- Lösung wie unter 2.1.1. beschrieben.

Es werden mehrere HbF_o-Präparationen durchgeführt, deren Hämoglobine im Versuch immer dieselben Ergebnisse zeigten. HbF_o-Lösungen, die einen MetHb-Anteil $\geq$ 4,5 % aufweisen, werden verworfen. Die elektrophoretische Überprüfung der Reinheit der HbF_o-Lösung zeigt keine Verunreinigung durch HbA_1 oder HbA_2. Eine mögliche Verunreinigung durch Spuren ($<$ 1%) von HbF_1 wird vernachlässigt.

2.1.1.3. Präparation der HbF_1-Lösung

Die Herstellung der HbF_1-Lösungen aus einem Citrat-Nabelschnurblut und die Chromatographie erfolgt wie unter 2.1.1.2. beschrieben. Es werden zwei Säulenchromatographien parallel durchgeführt. Nach eindeutiger Trennung dreier Banden (HbA, HbF_o und HbF_1) wird die langsamste Fraktion einer jeden Säule (HbF_1) aus dem Harz ausgegraben; nach ihrer Vereinigung wird das HbF_1 mit 140 ml eines 0,05 M TRIS-HCl-Puffers pH 6,5 vom DEAE Sephadex eluiert und durch O_2-Druck-Ultrafiltration auf 2,1 g% konzentriert. Die so gewonnene HbF_1-Lösung enthält eine Verunreinigung an HbF_o von ca. 5 %, die durch eine Rechromatographie abgetrennt wird. Dialyse und Einstellung der Hb-Konzentration der gewonnenen HbF_1-Lösung wie unter 2.1.1. angegeben.

Der MetHb-Gehalt einer HbF_o-Lösung, die parallel dem HbF_1 behandelt worden ist, beträgt 3,6 %. Die HbF_1-Lösung ist chromatographisch frei von HbF_o, HbA_1 und HbA_2; elektrophoretisch ist kein HbA_1, bzw. HbA_2 nachweisbar (Abb.1).

Alle Hb-Lösungen werden bei 4 °C und pO_2 = 700 Torr aufbewahrt. Die HbF_o- und HbA_1-Lösungen werden innerhalb von 7 Tagen verbraucht, die HbF_1-Lösungen innerhalb von 24 Stunden. Die angegebenen MetHb-Anteile der Hb-Lösungen beziehen sich auf den Zeitpunkt der Versuchsdurchführung. In den Hb-Lösungen ist kein 2,3-DPG nachweisbar ($\leq 10^{-7}$ M).

2.1.2. 2,3-Diphosphoglycerat (2,3-DPG):

Für die Versuche wird eine gereinigte 0,01 M 2,3-DPG-Säure pH 6,95 benötigt. Da die Ausgangssubstanz das Pentacyclohexylamoniumsalz der 2,3-DPG-Säure war, war eine Abtrennung der Pentacyclohexylamonium-Gruppen erforderlich.

Präparation:

25 ml Dowex 50 W-X 8, 200-400 mesh, H^+-Form (SERVA, Heidelberg) werden sechsmal mit warmen Aqua dest. gewaschen und anschließend in eine Säule (Ø 1,5 cm) gefüllt. Diese Säule wird mit 264 mg des 2,3-DPG-Salzes (BOEHRINGER, Mannheim), in 2,4 ml Aqua dest. gelöst, beschickt. Mit 19 ml Aqua dest. wird nachgewaschen. Die eluierte, freie 2,3-DPG-Säur ist ca. 0,013 M, und hat einen pH von 1,5 $\pm$ 0,1. Die genaue Molarität wird durch eine Titration eines Aliquots (4 ml) auf pH 10,0 mit 1 N, 0,1 N, und 0,01 N NaOH ermittelt. Das restliche 2,3-DPG wird mit 1 N und 0,1 N NaOH so auf pH 6,95 titriert, daß sich eine 0,01 M 2,3-DPG-Lösung ergibt. Dabei werden für 17 ml 2,3-DPG-Lösung ungefähr 800 µl 1 N NaOH benötigt. Das 2,3-DPG ist bei einem pH von 6,95 etwa 3,3-fach negativ geladen; seine Lösung besitzt eine Ionenstärke von 0,035 M (25). Sie wird bei 4 °C aufbewahrt.

2.1.3. Kaliumferricyanid ($K_3Fe(CN)_6$, FeCy)

Als Oxidationsmittel wird eine 1 x 10^{-2} M FeCy-Lösung (MERCK, Kaliumhexacyanoferrat (III), Darmstadt p.a.) verwendet, die aus einer 0,1 M Stammlösung durch Verdünnen mit Aqua dest. jeweils frisch hergestellt wird. Die Stammlösung enthält 0,25% wasserfreies Na_2CO_3, und wird nach 2-3 Wochen erneuert. Aufbewahrung im Dunkeln bei 4 °C.

Die Ionenstärke μ einer 2,5 x 10^{-4} M FeCy-Lösung (Küvettenkonzentration) beträgt 15 x 10^{-4} M (vollständige Dissoziation); das Redoxpotential des Redoxpaares Ferricyanid/Ferrocyanid ist +450 mV (96), das von DHb/Hb^+ +170 mV bei Standardbedingungen und pH 7,0 (110).

2.1.4. Triäthanolamin-Hydrochlorid-Puffer (TRAP-Puffer)

MGW 185,7, pK = 7,6, (BOEHRINGER, Mannheim)
Es wird ein 0,4 M TRAP-Puffer pH 6,95 benötigt. Für die Titration von 100 ml TRAP-Puffer werden etwa 3,7 ml 1 N NaOH verbraucht.

2.1.5. Kaliumchlorid (KCl)

Es wird eine 0,07 M KCl-Lösung benötigt (MERCK,Darmstadt,p.a.).

2.1.6. Äthylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz (EDTA)

Es wird eine 2 x 10^{-2} M EDTA-Lösung benötigt (MERCK, Darmstadt, p.a.).

2.2. Methoden

2.2.1. Bestimmung der Hb-Konzentration

2.2.1.1. Nach der Methode von Betke und Savelsberg (32)

Reagens:

Transformationslösung: KCN 200 mg; $K_3Fe(CN)_6$ 200 mg — In Aqua dest. lösen und auf 1000 ml auffüllen.

Durchführung:
0,1 ml Hb-Lösung und 10 ml Transformationslösung werden durchmischt und 30 Min. stehengelassen. Anschließend wird die Extinktion E der Lösung bei 540 nm gegen Aqua dest. ermittelt. Die Berechnung der Hb-Konzentration erfolgt nach der Formel:
E x 0,14 = Hb (g%)

2.2.1.2. Cyanhämoglobin-Schnellmethode (66,93)

Reagens:

Transformationslösung:
200 mg $K_3Fe(CN)_6$ p.a.
50 mg KCN p.a.
140 mg KNa_2PO_4 p.a.
0,5 ml Netzmittellsg. (Sterox SE 1%)
— In Aqua dest. lösen und auf 1000ml auffüllen.

Durchführung:
5 ml einer Transformationslösung werden mit 20 µl einer Hb-Lösung gemischt; nach mindestens 5 Min. wird die Extinktion E gegen die Transformationslösung bei 546 nm ermittelt. Die Hb-Konzentration ergibt sich nach der Formel: E x 36,7 = Hb (g%).

Beide Methoden ergaben dieselben Hb-Konzentrationen. Eine jede Hb-Bestimmung setzte sich aus dem Mittelwert von vier Einzelmessungen zusammen.

2.2.2. Bestimmung des MetHb-Anteils in den Hb-Lösungen nach der Methode von Evelyn und Malloy (63), Modifikation nach Marti

Die Hb-Lösungen werden durch Verdünnen mit Aqua dest. auf eine Hb-Konzentration von etwa 400 mg% gebracht. Zu 6 ml dieser Lösung werden 4 ml 0,1 M Phosphatpuffer pH 6,8 zugegeben. Nach Zentrifugation (10 Min. bei 5000 U/Min.) werden je vier ml des Überstandes auf zwei Reagenzgläser (a und b) verteilt. Die folgenden Messungen werden am Photometer bei 630 nm gegen Aqua dest. durchgeführt:

1.Messung, a_1: Extinktion der Hb-Lösung aus Glas a
2.Messung, a_2: Extinktion der Hb-Lösung aus Glas a nach Zugabe von einem Tropfen einer 5% KCN-Lösung
3.Messung, b_1: Extinktion der Hb-Lösung aus Glas b nach Zugabe von einem Tropfen einer 5% FeCy-Lösung und 10-minütiger Reaktionszeit
4.Messung, b_2: Extinktion der mit FeCy oxidierten Hb-Lösung nach Zugabe von einem Tropfen einer 5% KCN-Lsg.

Der prozentuale Gehalt an MetHb am gesamten Hb berechnet sich nach der Formel

$$\frac{a_1 - a_2}{b_1 - b_2} \times 100\% = \text{MetHb-\%}$$

Eine jede MetHb-Bestimmung wird aus vier Einzelmessungen gemittelt.

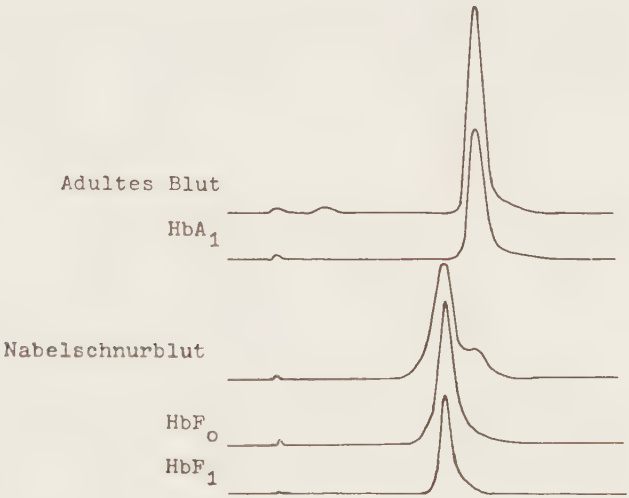
2.2.3. Polyacrylamid-Elektrophorese zur Überprüfung des Reinheitsgrades der Hb-Lösungen nach Wehinger (161):

6 µg - 27 µg der entsprechenden Hämoglobine wandern in einem Borsäure-NaOH-Puffer pH 9,0 auf einer mit TRIS-EDTA-Puffer eingeweichten Polyacrylamid-Folie (SARTORIUS, Göttingen) 45 Min. bei 20V. Auf Grund ihrer unterschiedlichen Ladungen trennen sie sich und können so identifiziert werden (Abb.1).

Es lassen sich Hb-Anteile bis 0,17 µg erkennen.

HbA_1 zeigt keine Verunreinigung durch HbA_2, oder HbF; HbF_o und HbF_1 zeigen keine Verunreinigung durch HbA_1 oder HbA_2 (Abb.1).

Abb.1

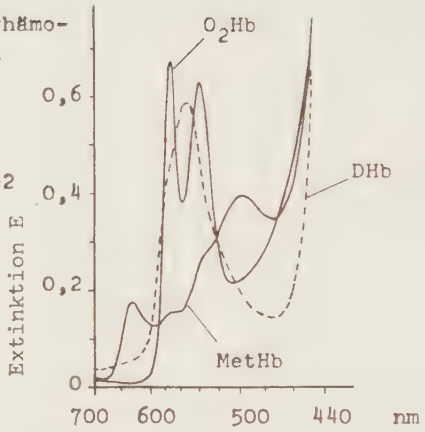


2.2.4. Meßmethode

Alle Versuche wurden spektralphotometrisch bei 578 nm verfolgt. Das Oxy-Hb besitzt bei dieser Wellenlänge ein Extinktionsmaximum (Abb.2), das deutlich von der Extinktion des MetHb unterschieden ist. Eine Extinktionsabnahme bei 578 nm ist also Ausdruck sinkender Konzentration von O_2Hb, die der Bildung von MetHb entspricht (sh. auch Kritik der Methoden, 4.5.3.). Gerät: Eppendorf Photometer mit angeschlossenem Kompensationsschreiber 4412, Filter 578 nm, Temperatur 25 °C.

Abb.2

Spektralkurven von Oxyhämoglobin (O_2Hb), Desoxyhämoglobin (DHb) und Methämoglobin (MetHb) bei einer Hb-Konzentration von 1,11 x 10^{-2} M = 75,1 mg%; pH 6,8, registriert mit dem Spektralphotometer Zeiss RPQ 20 A.



2.2.5. Durchführung der Versuche

2.2.5.1. Herstellen der Versuchsansätze

Die Versuchsansätze werden hergestellt aus einem Teil 0,4 M TRAP-Puffer, zwei Teilen 0,01 M 2,3-DPG-Lösung und einem Teil der jeweiligen 4 x 10^{-4} M Hb-Lösung (Häm); anstatt des 2,3-DPG werden für die 2,3-DPG-freien Proben zwei Teile Aqua dest., für die KCl-haltigen Proben zwei Teile 0,07 M KCl verwendet. Es ergeben sich Konzentrationen wie in 2.2.5.2. angegeben.

2.2.5.2. Versuchsbedingungen

Hb 1 $\pm$ 0,023 x 10^{-4} M (Häm); TRAP-Puffer 0,1125 M; 2,3-DPG 0,005 M, bzw. 2,3-DPG-frei ($< 10^{-7}$ M) oder mit 0,035 M KCl; pH 6,95 $\pm$ 0,015; 25 °C; λ = 578 nm; MetHb-Gehalt wie in 1.1. 1.angegeben; Gesamt-Ionenstärke μ: 0,114 M (ohne 2,3-DPG), bzw. 0,149 M (+ 0,005 M 2,3-DPG, bzw. + 0,035 M KCl).

2.2.5.3. pH der Versuchsansätze

Der pH der so erhaltenen Versuchansätze wird mit einem pH-Meter (Radiometer PHM 26) überprüft.
Die pH-Differenz zwischen der 2,3-DPG-freien und der 2,3-DPG-haltigen Probe war kleiner als 0,02 pH-Einheiten. Der pH nach Ablauf der Reaktion unterschied sich vom pH der Ausgangslösung um weniger als 0,02 pH-Einheiten. Der pH aller Versuchsansätze war 6,95 ± 0,015.

2.2.5.4. Meßvorgang bei den Versuchen in Luft

2 ml der HbA_1- und HbF_0-Reaktionsgemische werden nach mindestens 8 Min. Temperaturäquilibration bei 25 ± 0,2 °C und kurzem Schreibervorlauf mit 50 µl einer 10^{-2} M Ferricyanidlösung gestartet (HbF_1-Versuche jeweils das halbe Volumen). Gleichmäßige Verteilung des Oxidationsmittels erfolgt durch rasches Umrühren. Zur Überprüfung des Endpunktes der abgelaufenen Reaktion wurde mit einem 25 bis 100-fachen FeCy/Häm-Überschuß (M/M) nachgestartet. Es zeigte sich keine Extinktionsänderung, die über die durch die Verdünnung verursachte Änderung hinausging. Die Versuchsansätze werden bis zum Einpipettieren in die Glasküvetten offen an der Luft bei 4 °C gelagert.

2.2.5.5. Meßvorgang bei den Versuchen in O_2-Atmosphäre

Die Durchführung entspricht der bei den Versuchen in Luft (2.2.5.4.). Es sind die Küvetten jedoch verschlossen, die Versuchsansätze werden vor dem Start mind. 15 Min. mit reinem O_2 gleichmäßig durchperlt, das FeCy wird anaerob in die Küvette eingebracht, während der Reaktion wird die Probe mit O_2 begast, und die Versuchsansätze werden in jeweils abgeschlossenen Gefäßen mit intermittierender O_2-Durchperlung bei 4 °C gelagert.

III. Auswertung

3.1. Behandlung der aufgezeichneten Reaktionsabläufe

3.1.1. Umrechnen der Extinktionsänderungen auf prozentuale Umsätze

Die aufgezeichnete Extinktionsabnahme kommt durch die Abspaltung des O_2 vom Hb-Molekül und dem Übergang in MetHb zustande. Den verbleibenden, prozentualen Anteil an O_2Hb (y) am gesamten Hb (100% x $(O_2Hb)/(O_2Hb)+(MetHb)$) kann man mit Hilfe der Beziehung

$$y = 100\% - 100\% \times \frac{E_a - E_t}{E_a - E_\infty} \qquad (3\text{-}1)$$

aus den aufgezeichneten Reaktionsabläufen berechnen, wobei

E_a die Extinktion vor Beginn der Reaktion,
E_t die Extinktion zur Zeit t,
E_∞ die Extinktion nach vollständig abgelaufener Reaktion ist.

Y zur Zeit t = 0 (E_a=E_t) beträgt 100 % (Anfangssituation).

3.1.2. Ablesen der Extinktionswerte

Die Ablesegenauigkeit beträgt ± 0,15 %, die Photometerschwankungen bei geringen Extinktionsänderungen am Ende der Reaktion ca. ± 0,3 %. Aus dem Anfangsteil der Reaktionskurve, der durch Umrühren, Trägheit des Schreibers oder Neonlicht verzerrt ist (Totzeit), werden keine Extinktionswerte abgelesen, auch nicht durch Interpolation.

3.1.3. Verdünnung durch das Startvolumen

Durch den Start mit 50 µl FeCy-Lösung werden die Konzentrationen aller Substanzen in der Küvette um ein 40stel vermindert, d.h. die Ausgangsextinktion E_a ist um ein 40stel (2,5%) zu groß. Dieser Fehler wird bei der Umrechnung nach Punkt 3.1.1. nicht berücksichtigt und äußert sich deshalb in einer prozentualen O_2Hb-Konzentration von 97,5 % zur Zeit t = 0 (Ordinatenschnittpunkt der Reaktionskurven bei 97,5 %).

3.2. Graphische Auswertung der Reaktionsabläufe

Die nach 3.1. erhaltenen Meßpunkte werden logarithmisch gegen eine lineare Zeitskala aufgetragen, die so gewählt ist, daß die Streuung am deutlichsten hervortritt (Abb.12 - 18). Die hieraus gemittelten Reaktionskurven werden zum besseren Vergleich gegen eine fixe Zeitskala nocheinmal gezeichnet (Abb.3 - 11).
Reaktionen erster Ordnung (z.B. Dissoziationen) müßten in dieser Darstellung eine Gerade ergeben.

3.3. Bestimmung der Halbwertszeiten t/2

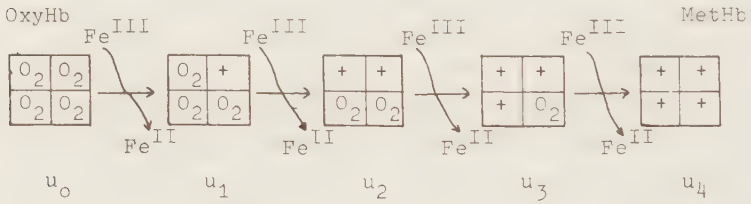
T/2, ein Maß zur Beurteilung der Reaktionsgeschwindigkeit, bedeutet die Zeit, nach der das ligandierte Hb zu 50 % in MetHb umgewandelt ist (Tab.I).

Da die Halbwertszeiten keine Aussage über das Reaktionsgeschehen erlauben, wurden die Reaktionskurven noch nach einem 4-Stufen-Modell ausgewertet.

3.4. Auswertung nach dem 4-Stufen-Modell

3.4.1. Ableitung

1925 erhielt Adair mit einem Reaktionsmodell, das die Oxygenation mit vier aufeinanderfolgenden Gleichgewichtsschritten beschreibt, eine gute rechnerische Anpassung an den sigmoiden Verlauf der O_2-Sättigungskurve des Hb (4). In Anlehnung an diese Vorstellung wurde ein 4-Stufen-Modell entwickelt, das die Oxidation in vier aufeinander folgende Reaktionsschritte zerlegt.
Das Reaktionsschema läßt sich wie folgt angeben:
Schema II



U_i stellen die Anteile der Hb-Moleküle an den gesamten Hb-Molekülen in den einzelnen Reaktionsstufen dar, c_{Hb} die Hb-Konzentration in Häm ($u_{o(t=0)} = c_{Hb}$). Eine messbare Rückreaktion ist unter den gewählten Bedingungen ausgeschlossen. Mit den Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten (RG-Konstanten) k_i und der Ferricyanidkonzentration c_{FeCy} läßt sich die zeitliche Veränderung der einzelnen Komponenten angeben ($u_i = \frac{du_i}{dt}$).

$$u_o = -k_1 c_{FeCy} u_o \qquad (3\text{-}2)$$
$$u_1 = k_1 c_{FeCy} u_o - k_2 c_{FeCy} u_1$$
$$u_2 = k_2 c_{FeCy} u_1 - k_3 c_{FeCy} u_2$$
$$u_3 = k_3 c_{FeCy} u_2 - k_4 c_{FeCy} u_3$$
$$u_4 = k_4 c_{FeCy} u_3$$

Die Lösung dieser Differentialgleichungen läßt sich durch das Zusammenfassen der RG-Konstanten k_i und der FeCy-Konzentration c_{FeCy} zur Reaktionskonstanten $L_i = c_{FeCy} k_i$ vereinfachen; hierbei geht c_{FeCy} in L_i als konstant ein. Die Differentialgleichungen lauten nun:

$$\begin{aligned} \dot{u}_o &= -L_1 u_o \\ \dot{u}_1 &= L_1 u_o - L_2 u_1 \\ \dot{u}_2 &= L_2 u_1 - L_3 u_2 \\ \dot{u}_3 &= L_3 u_2 - L_4 u_3 \\ \dot{u}_4 &= L_4 u_3 \end{aligned} \qquad (3\text{-}3)$$

Durch Auflösen dieses Gleichungssystems mit der Randbedingung, daß die Hb-Konzentration gleich bleibt

$$c_{Hb} = \sum_i u_i \ ,$$

erhält man die zeitliche Abhängigkeit der einzelnen Oxidationsstufen selbst (da es sich um eine einer Zerfallsreaktion vergleichbare Reaktion handelt, läßt sich die Lösung nach Bateman (17) anwenden).

$$u_o = c_{Hb} \exp(-L_1 t) \qquad (3\text{-}4)$$

$$u_1 = c_{Hb} L_1 \left(\frac{\exp(-L_1 t)}{(L_2 - L_1)} + \frac{\exp(-L_2 t)}{(L_1 - L_2)} \right)$$

$$u_2 = c_{Hb} L_1 L_2 \left(\frac{\exp(-L_1 t)}{(L_2-L_1)(L_3-L_1)} + \frac{\exp(-L_2 t)}{(L_1-L_2)(L_3-L_2)} + \frac{\exp(-L_3 t)}{(L_1-L_3)(L_2-L_3)} \right)$$

$$u_3 = c_{Hb} L_1 L_2 L_3 \left(\frac{\exp(-L_1 t)}{(L_2-L_1)(L_3-L_1)(L_4-L_1)} + \frac{\exp(-L_2 t)}{(L_1-L_2)(L_3-L_2)(L_4-L_2)} + \right.$$
$$\left. + \frac{\exp(-L_3 t)}{(L_1-L_3)(L_2-L_3)(L_4-L_3)} + \frac{\exp(-L_4 t)}{(L_1-L_4)(L_2-L_4)(L_3-L_4)} \right)$$

$$u_4 = c_{Hb} - \sum_i u_i$$

Der Verlauf der Reaktion ergibt sich aus der Summation von u_i zur Zeit t.

$$y_{(t)} = 100\% - \frac{\sum_i i u_i}{4 c_{Hb}} . \qquad (3\text{-}5)$$

Korrektur durch die Verdünnung beim Starten:

$$y_{(t)} = \left(100\% - \frac{\sum_i i u_i}{4 c_{Hb}} \right) \times 0{,}975 \qquad (3\text{-}6)$$

Durch Variation der L_i wird $y_{(t)}$ an den experimentell ermittelten Oxidationsverlauf angepaßt. Aus L_i ergeben sich RG-Konstanten durch $L_i / c_{FeCy} = k_i$.

Da sich das Hb_4 aus vier Untereinheiten zusammensetzt, sind für den ersten Reaktionsschritt viermal so viel reagierende Untereinheiten vorhanden als für den letzten Reaktionsschritt; das bedeutet, daß der erste Reaktionsschritt viermal wahrscheinlichen ist als der letzte; entsprechend ist der zweite Reaktionsschritt dreimal, der dritte zweimal wahrscheinlicher als der letzte. Deshalb werden zur Korrektur der Wahrscheinlichkeit k_1 durch vier, k_2 durch drei und k_3 durch zwei dividiert.

3.4.3. Durchführung der Berechnungen

Die rechnerischen Angleichungen werden im Rechenzentrum des Max-Planck-Institutes für Biochemie Martinsried mit Hilfe einer Siemens 4004-Großrechenanlage unter Anleitung und mit großzügiger Unterstützung von R.P. May durchgeführt. Es steht ein least square-Anpassungs-Programm von B.G. Louis (Fortran-Programm-Komplex BGL.-HLSF) zur Verfügung. Sein Kernstück ist eine abgeänderte Version eines Programms des University

of Wisconsin Computing Centre, das von R.P. May, P. Stöckel und H. Heumann in Fortran IV übersetzt und an die Rechenanlage in Martinsried adaptiert worden war.

Aus der Forderung, daß $\sqrt{\sum_i (y_{(t_i)} - y_i)^2}$ ($y_{(t_i)}$ = nach (3-6) errechneter Funktionswert (i), $y_{(i)}$ = gemessener Wert) minimal ist, folgt, daß den Meßpunkten bei kleinen t entsprechend den Exponentialfunktionen in (3-4) und der Meßgenauigkeit im Verlauf der Reaktion ein größeres Gewicht bei der Bestimmung der RG-Konstanten zukommt als den Meßpunkten bei großen t, d.h. in der Darstellung log y gegen die Zeit t (Abb.12 - 18) ist die Angleichung eines Reaktionsverlaufes an die gemessenen Werte trotz einer graphischen Abweichung bei großen t ($y \leqslant 3\%$) sehr gut.

Eine Wichtung der experimentellen Daten mit der Forderung, daß $\sqrt{\sum_i (\log y_{(t_i)} - \log y_i)^2}$ minimal sei, ergäbe zwar eine graphische Übereinstimmung des errechneten Reaktionsverlaufs mit den gemessenen Werten auch gegen Ende der Reaktion ($y \leqslant 3\%$), jedoch würden hierbei die gemessenen Werte gegen Ende der Reaktion in unzulässiger Weise zu stark gewertet.

3.4.3. Beurteilung der Angleichungen

Es können keine Standardabweichungen für die RG-Konstanten berechnet werden. Es lassen sich aber 95%- Vertrauensbereiche der RG-Konstanten angeben, die jedoch wegen bestimmter mathematischer Vereinfachungen die Qualität der Angleichungen etwas ungünstiger erscheinen lassen als sie tatsächlich ist. Innerhalb dieses Bereiches kann die RG-Konstante variieren, ohne daß die errechnete Kurve um mehr als die zweifache quadratische Abweichung von den Meßpunkten differiert.

3.4.4. Beschreibung des 4-Stufen-Modells

Das Modell faßt die Oxidation als eine aus vier einzelnen, irreversiblen Folgeschritten bestehende Reaktion nach oben angeführtem Reaktionsschema auf (S.40); bei einer Reaktion erster Ordnung ergibt dies innerhalb der Rechen- und Meßgenauigkeit identische RG-Konstanten. Dies würde bei der Oxidation isolierter Ketten oder beim Fehlen jeglicher Wechselwirkung zutreffen. Es lassen sich andererseits auch im Verlauf der Reaktion geänderte O_2-Affinitäten erkennen, z.B. durch eine Verminderung oder eine Steigerung der RG-Konstanten der (des) nachfolgenden Schritte (Schrittes).

Zwei gleichzeitig reagierende, unabhängige Reaktionsanteile, die sich voneinander unterscheiden (z.B. α_2- oder $ß_2$-Untereinheiten), werden in diesem Modell nicht erkannt. Zwei abhängige, aufeinander folgend reagierende Reaktionsanteile, die sich deutlich unterscheiden (z.B. rasche isolierte Oxidation der einen Ketten, dann eine langsamere Oxidation der anderen Ketten), lassen sich erkennen.

Das Modell geht davon aus, daß die Oxidation eines Häms an der gesamten Extinktionsänderung bei der Oxidation eines Hb-Tetramers zu einem Viertel beteiligt ist, und daß bei 578 nm die Reaktionsanteile u_o - u_4 den gleichen Extinktionskoeffizienten haben (sh. Punkt 3.5.3.).

3.5. Kritik der Methoden

3.5.1. Messung bei der Wellenlänge 578 nm

Für die Hb-Oxidation wurde in Anlehnung an Antonini, Brunori und Wyman ((9): O_2Hb-Oxidation bei 577 nm) eine Wellenlänge von 578 nm gewählt.

Wie in dem Abschnitt " Fragestellung " betont, ist bei der Oxidation von O_2Hb die Dissoziation des O_2 erforderlich. Infolge des Gleichgewichtes in Reaktion (I) (S.24) bilden sich teildesoxygenierte Zwischenstufen und in Spuren vollständig desoxygenierte Hb-Tetramere. Da nun das DHb bei 578 nm nicht isosbestisch mit dem MetHb ist (sh. Abb.2,S.36), könnte, wenn das DHb im Verlauf der Hb-Oxidation in deutlichen Konzentrationen auftritt, dies zu einer spektalen Überlagerung der Aufzeichnung der Oxidation des Hb führen.

Da nun bei pO_2 = 140 Torr, bzw. bei pO_2 = 700 Torr das Gleichgewicht in Reaktion (I) stark zugunsten des O_2Hb verschoben ist, die teildesoxygenierten Zwischenstufen auf ihrem Weg zum DHb durch die sehr rasche Oxidation des Ferricyanids laufend entfernt werden, kommt es zu keiner deutlichen Anhäufung von störenden desoxygenierten Hb-Molekülen und darf deshalb vernachläßigt werden.

3.5.2. Spektrale Änderungen durch die Zugabe von organischen Phosphaten zu O_2Hb

Die Zugabe von organischen Phosphaten (z.B. IHP, 2,3-DPG) verändert das Spektrum des O_2Hb im sichtbaren Bereich (5, 101,132). Bei 578,5 nm jedoch befindet sich ein isosbestischer Punkt des Differenzspektrums $(O_2Hb_{+DPG})-(O_2Hb_{ØDPG})$.

3.5.3. Spektral differente Zwischenstufen

Allgemein wird eine gleichmäßige Verteilung der spektralen Änderungen auf die vier sich bei Oxygenation, Desoxygenation, Oxidation und Reduktion ändernden Untereinheiten des Hb angenommen. Auch hier wird von dieser Annahme ausgegangen.

Die isolierten α-und ß Ketten zeigen jedoch unterschiedliche Absorptionsspektren (14). Gibson et al. (70,120) fand im intakten Hb-Tetramer nicht identische Spektren für die α-und ß Ketten. Es wären somit Zwischenstufen mit individuellen Absorptionsspektren denkbar.

Diese Befunde, die hauptsächlich das Soretgebiet umfassen, reichen jedoch nicht aus, um ihre Relevanz hinsichtlich der Messung der Oxidation von O_2Hb bei 578 nm richtig beurteilen zu können, insbesondere als die Bindung von n-Butylisocyanid an die α-und ß Ketten im intakten Tetramer bei 580 nm mit jeweils gleichen Absorptionsänderungen einhergeht (136).

3.5.4. Ferricyanidkonzentration in der Berechnung

Bei den Berechnungen nach dem 4-Stufen-Modell werden die Einzelreaktionen zwar als Reaktion 2.Ordnung (Reaktionspartner sind das Hb und das Ferricyanid) behandelt, jedoch mit einer gleichbleibenden Konzentration an Ferricyanid während der Reaktion. Im Falle eines großen Ferricyanid-Überschußes ist dies zu vernachlässigen. Der 2,5-fache Überschuß an Ferricyanid, der im Verlauf der Reaktion zunimmt, ist nun nicht so groß als daß sich keine Änderung seiner Konzentration bei der Reaktion zeigte. Die erste RG-Konstante k_1 ändert ihren Wert kaum. Entsprechend der Abnahme der Ferricyanidkonzentration ergeben sich jedoch mit zunehmender Reaktion zunehmend zu kleine RG-Konstanten.

Dieser Fehler ist aber nicht schwerwiegend, wie eine Kontroll-Versuchsserie (O_2HbF_o bei pO_2 = 700 Torr) mit einem molaren Ferricyanid/Häm-Überschuß von 4,0 zeigt; die relative Änderung der Ferricyanidkonzentration im Verlauf der Reaktion ist in diesem Fall viel geringer als bei einem molaren Ferricyanid/Häm-Überschuß von 2,5. Ein deutlicher Unterschied der

entsprechenden RG-Konstanten bei diesen beiden Bedingungen würde auf einen erheblichen Fehler in der Berechnung hinweisen. Dies wurde jedoch nicht gefunden (Tab.II, Abb.20).

Da zudem die Änderung der Ferricyanidkonzentration alle Versuche gleich betrifft, sind die RG-Konstanten k_1 - k_4 trotzdem direkt miteinander vergleichbar.

3.5.5. Einfluß von Ferrocyanid auf die Oxidationskinetik

Entsprechend der Oxidation der Häme entsteht im Verlauf der Oxidation aus Ferricyanid Ferrocyanid, das von MetHb (69,90, 137) und DHb (107,142) in geringem Ausmaß gebunden wird. Der Bindungsort soll dem des 2,3-DPG entsprechen (98). Auch Ferricyanid wird an das Hb gebunden, jedoch geringer als das Ferrocyanid (92).

In Abwesenheit von 2,3-DPG ist ein gewisser Einfluß des entstehenden Ferrocyanid auf die Oxidationskinetik denkbar. Doch wird die Ligandenbindung (n-Butylisocyanid) in Gegenwart eines 10-fachen Ferrocyanid/Häm-Überschusses nur gering beeinflusst(142), und die Kinetik der Ferricyanidoxidation von DHb bleibt nach Zugabe eines doppelten Ferrocyanid/Häm-Überschusses unbeeinflußt (9). Daher wird ein möglicher Einfluß des entstehenden Ferrocyanids auf die Hb-Oxidation durch Ferricyanid vernachläßigt.

In Gegenwart von 2,3-DPG nun konkurriert das Ferrocyanid mit dem 2,3-DPG um die Bindungsstelle am Hb; es wird sozusagen das effektive 2,3-DPG durch das uneffektive Ferrocyanid teilweise ersetzt, so daß ein veränderter 2,3-DPG-Effekt zustande kommt, wie in der Besprechung der Ergebnisse noch näher ausgeführt werden wird.

IV. Ergebnisse

4.1. Versuche bei pO_2 = 140 Torr (Luft)

4.1.1. Graphische Auswertung

Der Reaktionsablauf in Luft stellt sich in der graphischen Auswertung (halblogarithmisch) bei keiner Bedingung als eine Gerade dar (Abb.3 - 6), was eine Reaktion erster Ordnung ausschließt. Alle Reaktionen zeigen einen " biphasischen " Verlauf, wobei nur bei HbA_1 in Abwesenheit von 2,3-DPG eine Krümmung der Reaktionskurve auftritt, die etwa einer Reaktion zweiter Ordnung entspricht. Bei allen anderen Bedingungen erfolgt die Oxidation der Hämoglobine auch nicht nach dem Reaktionsmechanismus einer einfachen Reaktion zweiter Ordnung, die eine statistische (=gleichmäßige) Oxidation der vier Untereinheiten des Hb_4 beinhalten würde.

4.1.2. Auswertung nach den Halbwertszeiten t/2

Die Befunde sind in Tab.I und Abb. 3 - 6 dargestellt.
In Abwesenheit von 2,3-DPG ist HbA_1 nach 26,4 Sek., HbF_0 nach 15,3 Sek. und HbF_1 nach 9,7 Sek. zur Hälfte oxidiert; 5 mM 2,3-DPG verkürzt die Halbwertszeit t/2 bei HbA_1 um das 2,61-fache auf 10,1 Sek., bei HbF_0 um das 3,19-fache auf 4,8 Sek. und bei HbF_1 um das 1,18-fache auf 8,2 Sek.; in den KCl-haltigen Proben, die dieselbe Gesamt-Ionenstärke μ wie die 2,3-DPG-haltigen Proben besitzen (μ = 0,149 M), vermindert sich t/2 gegenüber den KCl-freien Proben bei HbA_1 um das 1,04-fache auf 25,3 Sek., bei HbF_0 um das 1,18-fache auf 13,0 Sek. und bei HbF_1 um das 1,10-fache auf 8,8 Sek.

2,3-DPG beschleunigt also die Oxidation von HbA_1 und HbF_o deutlich, der geringe Effekt auf HbF_1 jedoch ist durch die größere Ionenstärke in Gegenwart von 2,3-DPG verursacht; eine spezifische 2,3-DPG-Wirkung auf die Ferricyanidoxidation von O_2HbF_1 fehlt.

4.1.3. Auswertung nach dem 4-Stufen-Modell

Die einzelnen Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten (RG-Konstanten) aus der Auswertung nach dem 4-Stufen-Modell (Tab.II) sind in Abb. 19a dargestellt. Die hierdurch erzielten rechnerischen Angleichungen sind in Abb.12 - 14 illustriert.

Die unterschiedlichen Oxidationsgeschwindigkeiten, wie sie bereits an den Halbwertszeiten ablesbar sind, finden in Abb.19a ihren Ausdruck in den unterschiedlichen Niveaus der RG-Konstanten k_1 - k_4.

Allgemein ist eine Verminderung der RG-Konstanten der Zwischenstufen des zunehmend oxidierten Hb-Moleküls zu beobachten. In Abwesenheit von 2,3-DPG beginnt diese Verminderung bei HbA_1, HbF_o und HbF_1 bereits bei k_2, um eine Über-Alles-Verminderung der RG-Konstanten (k_1/k_4) um das 2,04-fache bei HbA_1, um das 3,27-fache bei HbF_o und um das 4,71-fache bei HbF_1 zu erreichen (Tab.III). In Gegenwart von 2,3-DPG ist eine Steigerung von k_2 gegenüber k_1 bei HbA_1 und HbF_o vorhanden, um dann wieder in k_3 und k_4 abzunehmen; HbF_1 zeigt diese Steigerung von k_2 nicht, seine RG-Konstanten verhalten sich parallel zu den RG-Konstanten der 2,3-DPG-freien Probe.

Bei HbF_o ist der 2,3-DPG-Effekt ($k_{i(+DPG)}/k_{i(\emptyset DPG)}$)(Abb.21a) auf k_2 größer als auf k_1; in k_3 und k_4 bleibt er unverändert; der 2,3-DPG-Effekt auf k_1 bis k_4 wird bei HbA_1 im Vergleich zu dem bei HbF_o zunehmend geringer. HbF_1 zeigt nur einen ge-

ringen, auf alle RG-Konstanten etwa gleich verteilten 2,3-DPG-Effekt.

In gleichem Ausmaß werden die RG-Konstanten von HbF_1 durch die Zugabe von 35 mM KCl (entsprechend der Gesamt-Ionenstärke der 2,3-DPG-haltigen Proben μ = 0,149 M) beeinflußt (Abb.22a). Die RG-Konstanten von HbA_1 und HbF_o werden ebenfalls gering durch 35 mM KCl gesteigert, doch deutlich weniger als durch 2,3-DPG.

In Abwesenheit von 2,3-DPG haben HbA_1, HbF_o und HbF_1 eine etwa gleich große RG-Konstante k_4 (Abb.19a u. Abb.23a; in Abb.23a sind die RG-Konstanten von HbF_o und HbF_1 als Vielfaches der entsprechenden RG-Konstanten von HbA_1 dargestellt); entsprechend verhält es sich bei k_3. Bei k_1 und k_2 jedoch unterscheiden sich HbA_1, HbF_o u. HbF_1 deutlich voneinander (Abb.23a).

4.2. Versuche bei pO_2 = 700 Torr (O_2-Atmosphäre)

4.2.1. Graphische Auswertung

Die Reaktionsabläufe in O_2-Atmosphäre stellen sich in der graphischen Auswertung wie bei den Luftversuchen bei keiner Bedingung als eine Reaktion erster Ordnung dar, und entsprechen auch nicht einer Reaktion zweiter Ordnung (Abb.7 - 10). HbA_1 und HbF_o zeigen in Gegenwart von 2,3-DPG einen leicht sigmoiden Reaktionsverlauf (Abb.15b, 16b u. Abb.9). Alle anderen Reaktionskurven gleichen in ihrer Form den Reaktionskurven der Versuche in Luft.

4.2.2. Auswertung nach den Halbwertszeiten t/2

Die Halbwertszeiten zeigen gegenüber der Versuchen in Luft bei den entsprechenden Bedingungen insgesamt eine Verminderung der Oxidationsgeschwindigkeit und eine Verminderung des 2,3-DPG-

Effektes auf die Oxidationsgeschwindigkeit (Tab.I):
In Abwesenheit von 2,3-DPG ist HbA_1 nach 112,8 Sek., HbF_o nach 63,7 Sek. und HbF_1 nach 39,7 Sek. zur Hälfte oxidiert; 5 mM 2,3-DPG verkürzt t/2 bei HbA_1 um das 2,14-fache auf 52,8 Sek., bei HbF_o um das 2,07-fache auf 30,7 Sek. und bei HbF_1 um das 1,16-fache auf 33,2 Sek.

In Gegenwart von 35 mM KCl vermindert sich t/2 bei HbA_1 um das 1,03-fache auf 109,1 Sek., bei HbF_o um das 1,03-fache auf 61,7 Sek. und bei HbF_1 um das 1,13-fache auf 33,9 Sek. (Tab.I).

2,3-DPG beschleunigt also auch bei pO_2 = 700 Torr die Oxidation von HbA_1 und HbF_o deutlich. Diese Beschleunigung durch 2,3-DPG ist eindeutig größer als die Beschleunigung durch eine dem 2,3-DPG entsprechende Ionenstärke. Die geringe 2,3-DPG-Wirkung auf die Oxidation von HbF_1 hingegen ist auch bei pO_2 = 700 Torr nicht spezifisch für 2,3-DPG.

4.2.3. Auswertung nach dem 4-Stufen-Modell

Die errechneten RG-Konstanten (Tab.II) sind in Abb.19b dargestellt, die hierdurch erzielten rechnerischen Angleichungen in den Abb.15 - 17.

Die unterschiedlichen Oxidationsgeschwindigkeiten, wie sie bereits an den Halbwertezeiten ablesbar sind, finden in Abb. 19b ihren Ausdruck in den unterschiedlichen Niveaus der RG-Konstanten k_1 - k_4. Wie in Luft findet sich in Abwesenheit von 2,3-DPG bei HbA_1, HbF_o und HbF_1 eine von k_2 nach k_3 und k_4 zunehmende Verminderung der RG-Konstanten; die Über-Alles-Verminderung der RG-Konstanten (k_1/k_4) jedoch ist bei pO_2=700 Torr geringer als bei pO_2 = 140 Torr (Tab.II): k_1/k_4 bei pO_2= 700 Torr beträgt bei HbA_1 1,5, bei HbF_o 2,89 und bei HbF_1 3,61.

In Gegenwart von 2,3-DPG werden bei HbA_1 und HbF_o k_2 und k_3 gegenüber k_1 gesteigert, k_4 gegenüber k_1 vermindert (Abb.19b). Es zeigen sich also in O_2-Atmosphäre bei der Oxidation von HbA_1 und HbF_o in Gegenwart von 2,3-DPG mehr reaktionsfreudigere Zwischenstufen als in Luft. Die 4 RG-Konstanten von HbF_1 ändern sich dagegen in Gegenwart von 2,3-DPG um jeweils den gleichen Faktor, d.h. proportional den RG-Konstanten der 2,3-DPG-freien Probe (Abb.19b).

Der 2,3-DPG-Effekt auf k_1 und k_2 ist bei HbA_1 und bei HbF_o in O_2-Atmosphäre deutlich kleiner als in Luft (Abb.21b), während der 2,3-DPG-Effekt auf k_3 und k_4 in Luft dem in O_2-Atmosphäre gleicht, sowohl bei HbA_1, als auch bei HbF_o (k_3 u. k_4 in Abb.21b). Der sich im Verlauf der Oxidation in O_2-Atmosphäre stärker entfaltende 2,3-DPG-Effekt als in Luft bei HbA_1 und HbF_o folgt also lediglich aus der Verminderung des 2,3-DPG-Effektes auf k_1 und k_2 durch die höhere O_2-Konzentration in O_2-Atmosphäre gegenüber in Luft.

Der Effekt von 35 mM KCl auf die RG-Konstanten (Abb.22b) ist auch in O_2-Atmosphäre gering, auf k_1 - k_4 etwa gleichmäßig verteilt und geringer als der 2,3-DPG-Effekt bei HbA_1, bzw. bei HbF_o, entspricht aber dem bei HbF_1.

In Abwesenheit von 2,3-DPG unterscheiden sich auch in O_2-Atmosphäre $k_{4(HbF_1)}$ und $k_{4(HbF_o)}$ nur gering von $k_{4(HbA_1)}$, ebenso $k_{3(HbF_o)}$ und $k_{3(HbF_1)}$ nur wenig von $k_{3(HbA_1)}$ (Abb.23b). Bei k_2 und k_1 jedoch treten große Unterschiede zwischen HbF_o und HbF_1 gegenüber HbA_1 auf.

4.3. Versuche mit einem (FeCy/Häm)-Überschuß von 4,0 (M/M)

Es wurde HbF_o in O_2-Atmosphäre bei einem molaren Ferricyanid-Überschuß (über Häm) von 4,0 oxidiert (sh. 3.5.4. Kritik der Methoden,S.46).

Die beim 2,5-fachen Ferricyanidüberschuß beobachtete sigmoide Form des Reaktionsverlaufes in Gegenwart von 2,3-DPG bleibt erhalten, in Abwesenheit von 2,3-DPG verschwindet sie (Abb. 11 und 18).

Der 1,6-fach größere Ferricyanidüberschuß beschleunigt die Oxidation von HbF_o in Abwesenheit von 2,3-DPG um das 1,7-fache auf 37,1 Sek. (t/2), in Gegenwart von 2,3-DPG um das doppelte auf 15,4 Sek. (Tab.I). Durch 2,3-DPG ergibt sich eine 2,41-fache Beschleunigung der Oxidation (Abb.11). Bei der Auswertung nach dem 4-Stufen-Modell werden die einzelnen RG-Konstanten in derselben Weise verändert wie bei einem 2,5-fachen Ferricyanidüberschuß, sowohl in Gegenwart, als auch in Abwesenheit von 2,3-DPG (Abb.20, Tab.II); daraus folgt, daß der Fehler auf Grund des sich im Verlauf der Reaktion ändernden Ferricyanid/Häm-Verhältnisses bei der Bestimmung der absoluten Werte der RG-Konstanten nicht erheblich ist (sh. auch Kritik der Methoden,S.46).

4.4. Versuche mit EDTA

Ferricyanid vermag auch mit dem Proteinanteil des Hb zu reagieren (113,137,138). Um eine Beeinflussung der Reaktion hierdurch zu erkennen, wurden Parallelversuche mit 5 - 35 mM EDTA (Äthylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz), das die Oxidation der SH-Gruppen durch Ferricyanid verhindert, durchgeführt.
In Übereinstimmung mit Antonini (9) bleiben die Reaktionsabläufe auf die Zugabe von EDTA hin unverändert.

V. Besprechung der Ergebnisse

5.1. Die Hb-Oxidation durch Ferricyanid in Abwesenheit von 2,3-DPG

Die Oxidationsgeschwindigkeit von ligandiertem Hb durch Ferricyanid wird sowohl von physikalisch-chemischen Größen wie O_2 und Ferricyanidkonzentration, als auch von intrinsischen Eigenschaften des Hb wie O_2-Affinität und Redoxpotential beeinflußt.

5.1.1. Abhängigkeit von physikalisch-chemischen Größen

Diese Größen verändern die Oxidationskinetik der verschiedenen Hämoglobine in gleicher Weise.

5.1.1.1. O_2-Konzentration

Die Halbwertszeiten (Tab.I) und die RG-Konstanten (Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten) nach dem 4-Stufen-Modell (Abb.19) zeigen eine verminderte Geschwindigkeit der Hb-Oxidation in O_2-Atmosphäre gegenüber den Versuchen in Luft.

Das von Connant (54) beschriebene Ansteigen des Redoxpotentials eines DHb/MetHb-Redoxsystems durch Zuleiten von O_2, das sich in einer verminderten Oxidationsgeschwindigkeit äussert, dürfte die Folge der dadurch verursachten Verminderung der DHb-Konzentration, die das Redoxpotential erhöht, sein, und nicht eine direkte Wirkung des O_2 auf das Redoxverhalten des Hb.

Somit bestätigt die Verminderung der Oxidationsgeschwindigkeit in O_2-Atmosphäre gegenüber den Versuchen in Luft den von Connant (54), Roughton (141) und Betke (35,37) vorgeschlagenen Reaktionsmechanismus der Hb-Oxidation durch Ferricyanid, der der eigentlichen Oxidation des Hb die Gleichgewichtsreaktion $O_2Hb \rightleftharpoons O_2 + DHb$ (Reaktion (I) in Schema I, S. 24), vorlagert, insofern, als sie allein aus der Verschiebung dieses Gleichgewichts zur Seite des O_2Hb resultiert.

Dieser hemmende Effekt der steigenden O_2-Konzentration ist im Verlauf der O_2-freisetzenden Hb-Oxidation bei pO_2 = 140 Torr ausgeprägter als bei pO_2 = 700 Torr. In Luft ändert sich die O_2-Konzentration von $2{,}548 \times 10^{-4}$ M auf $3{,}548 \times 10^{-4}$ M, in O_2-Atmosphäre jedoch nur von $12{,}74 \times 10^{-4}$ M auf $13{,}74 \times 10^{-4}$ M; entsprechend ist der Quotient der RG-Konstanten k_1/k_4, in dem dieser hemmende Effekt der steigenden O_2-Konzentration enthalten ist, in Luft größer als in O_2-Atmosphäre (Tab.III).

5.1.1.2. Ferricyanidkonzentration

Die Halbwertszeiten und die RG-Konstanten nach dem 4-Stufen-Modell bei einem molaren Ferricyanid/Häm-Überschuß von 4,0 (Tab.I, Abb.20) zeigen am HbF_o, daß die Oxidation unabhängig vom Ferricyanid/Häm-Überschuß ist, d.h. daß sich die Oxidationsgeschwindigkeit proportional der Ferricyanidkonzentration ändert, und daß die Oxidation des DHb der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Gesamtreaktion ist.

Diese einfache Gesetzmäßigkeit zwischen der Ferricyanidkonzentration und der Oxidationsgeschwindigkeit bestätigt auch

ältere Befunde von Betke et al. über die Ferricyanidoxidation von Erwachsenen-O_2Hb (36). Antonini et al. fanden für die Ferricyanidoxidation von Erwachsenen-DHb dieselbe Gesetzmäßigkeit(9).

5.1.2. Abhängigkeit der Hb-Oxidation von intrinsischen Größen des Hb

Die O_2-Affinität des Hb regelt das vorgeschaltete Gleichgewicht $O_2Hb \rightleftharpoons DHb + O_2$ in Reaktion (I) (S.24), das Redoxpotential beeinflußt die eigentliche Oxidation des desoxygenierten Hb zum MetHb in Reaktion (II).

5.1.2.1. Redoxpotential (E)

Das Redoxpotential E ist der gebräuchliche Ausdruck, die Elektronenaffinität einer Molekülspezies zu beschreiben, d.h. je positiver das Redoxpotential, desto geringer die Neigung des DHb in die Met-Form überzugehen. Da das Redoxverhalten bei der Bestimmung von $E_{1/2}$ (Redoxpotential bei Halboxidation) von der Art des verwendeten Elektronenübermittlers wie auch der angewandten Methode abhängt (8,65), differieren frühere Angaben über das Redoxverhalten des Hb. Jüngere Befunde von Kilmartin (1973) und Abraham u. Taylor (1972) ergeben gut übereinstimmende Redoxpotentiale.

Bei pH 7 beträgt $E_{1/2}$ für die isolierten α_{SH} Ketten ca.+50 mV (14,2), für die isolierten $ß_{SH}$ Ketten ca.+107 mV (2,14), und für die γ_{SH} Ketten +98 mV (2). Das größere Redoxpotential der ß Ketten gegenüber den α Ketten bleibt auch im intakten Tetramer erhalten. $E_{1/2}$ wurde bei pH 7 von HbA mit ca. +147 mV (8, 98), von HbF mit +161 mV (2) bestimmt.

Die unter diesem Gesichtspunkt unerwartete, schnellere Oxidation von HbF_o gegenüber HbA_1 in Luft und in O_2-Atmosphäre (Tab.I) zeigt, daß das Redoxpotential auf die Ferricyanidoxidation von ligandiertem Hb keinen dominierenden Einfluß ausübt.

Ein solcher fehlender Einfluß des Redoxpotentials ergibt sich auch, wenn man die Unterschiede in den Redoxpotentialen der einzelnen Ketten vergleicht mit den RG-Konstanten nach dem 4-Stufen-Modell in Abb.23, die, wie weiter unter noch ausgeführt werden wird, keine vorrangige Oxidation der α Ketten zeigen, die auf Grund der Redoxpotentiale zu erwarten wäre.

Ein den Redoxpotentialen jedoch entsprechendes Verhalten konnte Winterhalter für die Autoxidation von HbA direkt nachweisen (vorrangige Oxidation der α Ketten)(111). Dieser Unterschied zwischen der Ferricyanidoxidation und der Autoxidation wird später diskutiert.

5.1.2.2. O_2-Affinität (p_{50})

Unter dem Gesichtspunkt der O_2-Affinität der verschiedenen Hämoglobine ergibt sich eine Übereinstimmung des theoretisch zu erwartenden Oxidationsverhaltens mit den vorliegenden Ergebnissen:

Der p_{50} als reziproker Ausdruck der O_2-Affinität der tetrmeren Hämoglobine und der isolierten Ketten ist in Tabelle IV zusammengestellt:

Tabelle IV

O_2-Affinität tetramerer Hämoglobine und isolierter Ketten

	HbA_1	HbF_o	HbF_1	α_{SH}	β_{SH}	γ_{SH}	$\gamma^{1Val\text{-}acetyl}$
p_{50}	1,41	1,90	2,37	0,50	0,43	0,94	——
Literat.	(49)	(49)	(49)	(10)	(10)	(116)	——
Bedingungen	10^oC;pH7,2;0,1M NaCl; 0,05 M bis-Tris;2 x 10^{-4} M Häm.			20^oC;pH6,7; 0,15 M Phosphat;10^{-4} M Häm.		20^oC;pH7; 0,05 M Phosphat;$5x10^{-5}$ M Häm.	

In Übereinstimmung mit früheren Befunden von Betke (33) über die Ferricyanidoxidation von fetalem und adultem Hb nimmt die Oxidationsgeschwindigkeit in der Reihenfolge $HbA_1 < HbF_o < HbF_1$ zu (Tab.I,Abb.3,4,5 u. Abb.7,8,9). Dies ergibt sich daraus, daß die in derselben Reihenfolge fallende O_2-Affinität das Gleichgewicht in Reaktion (I) immer mehr nach der Seite des DHb verschiebt. Diese Interpretation wird auch durch Befunde von Betke (34) nahegelegt, der fand, daß der Sauerstoff von fetalem O_2Hb schneller abdissoziiert als von adultem O_2Hb (Dithionitmethode).

Bisher wurde das Hb-Molekül als eine Einheit betrachtet. Da sich nun das Hb-Molekül aus einzeln oxidierbaren Untereinheiten zusammensetzt, wurde versucht, die Oxidation dieser Untereinheiten mit Hilfe des 4-Stufen-Modells sichtbar zu machen. Die hierdurch erhaltenen Muster an RG-Konstanten legen unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Eigenschaften der einzelnen Ketten den Schluß einer bevorzugten Oxidation der Nicht-α-Ketten durch Ferricyanid nahe: Wie in Abb.23 ersichtlich,

unterscheiden sich nämlich die individuellen RG-Konstanten nach dem 4-Stufen-Modell in der ersten Hälfte der Oxidation (k_1,k_2) deutlich voneinander, in der zweiten Hälfte der Oxidation (k_3,k_4) jedoch liegen sie nah beieinander; dies trifft sowohl in Luft, als auch in O_2-Atmosphäre zu.

Die beobachteten Kinetiken sind spezifisch für den jeweiligen Hb-Typ, unabhängig vom Ferricyanid/Häm-Verhältnis. Dies zeigen die gleichartigen Ergebnisse bei der HbF_o-Oxidation in Gegenwart eines Ferricyanid/Häm-Überschusses von 2,5 und 4,0 (Abb.23b). Die nah beieinanderliegenden RG-Konstanten k_3 und k_4 dürften der Oxidation der α Ketten entsprechen, die den drei Hämoglobinen HbA_1, HbF_o u. HbF_1 gemeinsam sind, während die sich deutlich unterscheidenden RG-Konstanten k_1 und k_2 der Oxidation der Nicht-α-Ketten, also der ß-, γ- und $\gamma^{1Val-acetyl}$-Ketten der drei Hämoglobine, entsprächen. Die vorliegenden kinetischen Befunde bedeuten demnach, daß die Oxidation der Nicht-α-Ketten durch Ferricyanid der Oxidation der α Ketten vorausgeht.

Diese Interpretation wird gestützt durch die Befunde über die Heterogenität der einzelnen Ketten in ihrer Ligandenaffinität:

Die Assoziation und Dissoziation von O_2 läuft im Hb-Tetramer bei den ß Ketten schneller ab als bei den α Ketten (bei pH 7,0 ist $k_{d(\alpha)}$ ca. 13 Sek.$^{-1}$, $k_{d(ß)}$ ca. 21 Sek.$^{-1}$)(50,120,150). Wenn nun ein Gleichgewicht zwischen ligandiertem und nichtligandiertem Hb gestört wird (etwa durch Oxidation des DHb), so werden sich die ß Ketten schneller auf das neue Gleichgewicht einstellen und die α Ketten " hinterherhinken ", d.h. die α Ketten zeigen hierbei eine größere O_2-Affinität als die ß Ketten und werden daher später oxidiert. Versuche mit n-Butylisocyanid und sechs weiteren Isocyaniden (123) als Liganden stützen diese Befunde über die α/ß-Kettenheterogenität (119,121,122,124).

Entsprechende Befunde über eine Kettenheterogenität hinsichtlich der Dissoziation und der Assoziation von O_2 in HbF_o und HbF_1 liegen m.W. nicht vor, lassen sich aber aus unseren Daten ableiten:

Wie in HbA_1 erfolgt nämlich eine vorrangige Oxidation der Nicht-α-Ketten auch in HbF_o, bzw. HbF_1 (Abb.23). Dies bedeutet, daß im HbF_o, bzw. im HbF_1 die Reaktivität der γ^-, bzw. $\gamma^{1\text{Val-acetyl}}$-Ketten gegenüber O_2 größer ist als die der α Ketten.

Befunde von Kernohan (94) und Sirs (148) über die Dissoziation des ersten O_2 ($k_{d(4)}$) vom oxygenierten Schafhämoglobin A und B bestätigen die höhere Reaktivität der Nicht-α-Ketten. Beide fanden, daß diese Schafhämoglobine, die identische α Ketten, jedoch unterschiedliche ß Ketten besitzen, unterschiedliche Konstanten für die Dissoziation des O_2 vom ersten Häm haben. Ebenso unterscheiden sich nach Hollander (87) HbA und HbF in ihren $k_{d(4)}$. Dies spricht ebenfalls dafür, daß die Dissoziation des O_2 zuerst von den Nicht-α-Ketten erfolgt, und somit deren Oxidation vorrangig abläuft.

Die hier bestätigte größere Reaktionsbereitschaft der Nicht-α-Ketten gegenüber den α Ketten im tetrameren Verband steht auch in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Blanck und Scheler (38; 1966) und von Davis et al. (55) über die reaktionskinetischen Eigenschaften der α-, ß- und γ Ketten im MetHb: Wie im zweiwertigen HbA sind die α^+ Ketten auch im MetHb kinetisch langsamer als die $ß^+$- oder die γ^+ Ketten.

5.1.3. Unterschied zwischen der Hb-Oxidation durch Ferricyanid und der Autoxidation

Die hier gefundene vorrangige Oxidation der Nicht-α-Ketten durch Ferricyanid steht im Gegensatz zur vorrangigen Oxidation der α Ketten bei der Autoxidation (111). Dieser scheinbare Widerspruch erklärt sich aus der schnelleren O_2-Assoziation und O_2-Dissoziation der Nicht-α-Ketten.

Im Gegensatz zur Ferricyanidoxidation wird bei der vergleichsweise langsamen Autoxidation das Gleichgewicht $O_2Hb \rightleftharpoons O_2 + DHb$ in Reaktion (I) (S.24) praktisch nicht verschoben, so daß sich die schnellere Dissoziation des O_2 von den Nicht-α-Ketten nicht auswirkt. Es kann nun das kleinere Redoxpotential der α Ketten im DHb, falls der Mechanismus der Autoxidation über das DHb abläuft, eine vorrangige Oxidation der α Ketten bewirken. Die Tatsache jedoch, daß die Autoxidation von Hb oder Myoglobin ein O_2-verbrauchender Prozess ist (45,68,97), es eine optimale O_2-Konzentration gibt, unter oder über der die Autoxidation zunehmend gehemmt wird (44,96), und auch daß die Bildung eines Superoxid-Anions, das an das Hämeisen ligandiert ist, möglich ist (137,162,163,164), machen einen Vergleich der Autoxidation und der Ferricyanidoxidation hinsichtlich ihres Reaktionsmechanismus schwierig, wenn nicht unmöglich.

Die von Mansuri und Winterhalter angedeutete, mit den hier vorliegenden Ergebnissen im Widerspruch stehende vorrangige Oxidation der α Ketten auch bei der Ferricyanidoxidation (111) ist nicht durch Daten belegt und daher nicht ausreichend zu beurteilen. Unter den von Mansuri und Winterhalter gewählten Bedingungen, nämlich einer Oxidation durch Ferricyanid bis zu einem MetHb-Gehalt von 50%, sind die Verhältnisse hinsichtlich der Frage, welche Ketten nun als erste oxi-

diert worden waren, unübersichtlich. Das zuletzt resultierende Verhältnis oxidierter α^+- und ß Ketten kann beeinflußt werden durch einen Hämaustausch (80,88), sowie durch eine " Rückverteilung positiver Ladungen " von den $ß^+$ Ketten auf die zweiwertigen α Ketten (61,106). Da in Gegenwart von Cyanid der Hämaustausch jedoch nur sehr langsam erfolgt (48), dürfte dieser den Unterschied zwischen unseren kinetischen Befunden und der Winterhalter'schen Beobachtung nicht erklären. Inwieweit allerdings die von MacQuarry und Gibson (106) angesprochene " Rückverteilung positiver Ladungen " (schematisch: $\alpha_2ß_2^+ \longrightarrow \alpha_2^+ß_2$) trotz ursprünglich bevorzugter ß Ketten-Oxidation schließlich zu einem Überwiegen der oxidierten α^+ Ketten führen mag, kann nicht entschieden werden, da m.W. entsprechende Untersuchungen in Gegenwart von Cyanid nicht vorliegen.

5.2. Hb-Oxidation durch Ferricyanid in Gegenwart von 2,3-DPG

5.2.1. Einfluß des 2,3-DPG auf die Halbwertszeit (t/2)

Das Hb-Molekül wird zunächst wieder als eine Einheit betrachtet.

2,3-DPG beschleunigt in Luft und in O_2-Atmosphäre die Oxidation von HbA_1 und HbF_o deutlich, von HbF_1 praktisch nicht (Tab.I, Abb.3,4,5 und Abb.7,8,9,11). Dies ist zunächst einmal allgemein Ausdruck für das in Reaktion (I) nach rechts verschobene Gleichgewicht $O_2Hb \rightleftharpoons O_2 + DHb$, was Bauer et al. (19) mittels kinetischer Untersuchungen nachweisen konnte. Die geringere 2,3-DPG-Wirkung in O_2-Atmosphäre gegenüber in Luft bestätigt die von Benesch und Benesch gefundene reziproke Bindung zwischen O_2 und 2,3-DPG an humanes Hb (26): Die erhöhte O_2-Konzentration vermindert die Bindung von 2,3-DPG an das Hb und bedingt so einen allgemein geringeren 2,3-DPG-Effekt in O_2-Atmosphäre als in Luft.

5.2.2. Bindungsunterschiede von 2,3-DPG an verschiedene Hb - Typen und partielle Methämoglobine

Zur detailierteren Analyse des 2,3-DPG-Effektes ist die unterschiedlich starke Bindung des 2,3-DPG an O_2Hb, DHb, MetHb und mögliche Zwischenformen von Bedeutung:

Nach Benesch (26,27,28) bindet O_2Hb kein 2,3-DPG. Anderen Autoren zufolge wird 2,3-DPG an das O_2Hb gebunden, jedoch in viel geringerem Ausmaß als an das DHb (31,53,67,77,135, 154). Daß letzteres auch stereochemisch möglich ist, zeigten Benesch et al. anhand des 2-nor-2formylpyridoxal-5'-phosphat-ligandierten humanen Hb (29) (dieser Ligand wird kovalent zwischen die ß Ketten an die 2,3-DPG-Bindungsstellen Val NA1 (1)$ß_1$ u. Lys EF6(82)$ß_2$ gebunden (30)); in diesem Hb erfolgt bei reduzierter O_2-Affinität ein quarternärer Strukturwechsel im Verlauf der Oxygenation. IHP wird ebenfalls an das O_2Hb gebunden (72,152).

Die Assoziationskonstante k_{ass} von 2,3-DPG für DHb ist 6,7 x 10^4 M^{-1}, k_{diss} = 1,5 x 10^{-5} M (28), k_{ass} von IHP für DHb ist 10^8 M^{-1} (28). Die Affinitätskonstante von 2,3-DPG für O_2Hb ist ca. 38-fach geringer als für DHb (78). Teiloxygenierte Zwischenstufen des Hb zeigen eine beträchtliche Affinität für 2,3-DPG (153). K_{diss} von 2,3-DPG für MetHb beträgt 1,2 x 10^{-3} M (78), k_{ass} ca. 1,59 x 10^2 M^{-1} (130).

Infolge unterschiedlicher Versuchsbedingungen sind diese Konstanten nicht direkt miteinander vergleichbar, jedoch ergibt sich eine Abnahme der 2,3-DPG-Bindung in der Reihenfolge DHb > >MetHb > O_2Hb (53). HbF bindet 2,3-DPG im oxygenierten und desoxygenierten Zustand geringer als HbA (154). Der p_{50} von HbF_1 wird durch 2,3-DPG nicht beeinflußt (49); man verneint daher eine 2,3-DPG-Bindung an O_2HbF_1, bzw. $DHbF_1$.

Partiell oxidierte Hb-Hybride binden 2,3-DPG ebenfalls unterschiedlich:
Nach Bauer et al. (20) ist bei pH 7,0 $k_{ass(\alpha_2\beta_2)}$=1,5 x 10^5 M^{-1}, $k_{ass(\alpha_2^+(CN)\beta_2)}$= 4,5 x 10^4 M^{-1}, und $k_{ass(\alpha_2\beta_2^+(CN))}$= 1,8 x 10^4 M^{-1}. Der 2,3-DPG-Effekt auf den p_{50} in 0,1 M NaCl, pH 7 ($p_{50(+DPG)}/p_{50(\emptyset DPG)}$) ist bei $\alpha_2(O_2)\beta_2(O_2)$ 2,7, bei $\alpha_2^+(CN)\beta_2(O_2)$ 3,5 und bei $\alpha_2(O_2)\beta_2^+(CN)$ 1,7 (109). Die ß Ketten im zweiwertigen Zustand binden also 2,3-DPG stärker und zeigen einen größeren 2,3-DPG-Effekt als im dreiwertigen Zustand. Befunde von Cassoly (50) und Ogata (118) stützen dies.

Nach Gibson (71) erfolgt die Zusammenlagerung von DHb und 2,3-DPG zum äquilibrierten DHb·DPG-Komplex sehr rasch im Vergleich zur Anlagerung des O_2 an das DHb, so daß sich für jede Zwischenstufe des Hb bei der Oxygenation nahezu ein Gleichgewicht zwischen der jeweiligen Zwischenstufe und dem 2,3-DPG einstellt.

5.2.3. Einfluß unterschiedlicher Ionenstärken in den Reaktionsansätzen

In unseren Untersuchungen beträgt die Gesamt-Ionenstärke der Reaktionsansätze in Gegenwart von 5 mM 2,3-DPG 0,149 M, in seiner Abwesenheit 0,114 M. Steigende Ionenstärke begünstigt die Desoxygenation von O_2Hb (147) und erhöht auch die Oxidationsstärke des Ferricyanids (116). Die daraus resultierende Beschleunigung der Hb-Oxidation wurde von Betke für O_2HbA gezeigt (35) und für O_2HbA_1, O_2HbF_o und O_2HbF_1 in einer Reihe von Vorversuchen im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen bestätigt. Daß jedoch nicht die in Gegenwart von 2,3-DPG größere Gesamt-Ionenstärke für die beschleunigte Oxidation des O_2HbA_1 und O_2HbF_o verantwortlich ist, zeigen die Kontrollversuche mit 35 mM KCl, das der Ionenstärke von 5 mM 2,3-

DPG entspricht (Abb.4,8,22,21).
Beim HbF_1 wird mit 35 mM KCl derselbe geringe Effekt erzielt wie mit 5 mM 2,3-DPG, d.h. der " 2,3-DPG-Effekt " beim HbF_1 ist ein Ionenstärke-Effekt, sowohl in Luft, als auch in O_2-Atmosphäre (Abb.21,22).

5.2.4. Oxidationsablauf in Gegenwart von 2,3-DPG

Entscheidend für die Hb-Oxidation durch Ferricyanid in Gegenwart von 2,3-DPG sind die Bindungsunterschiede des 2,3-DPG an die einzelnen unterschiedlich oxygenierten und unterschiedlich oxidierten Zwischenprodukte, die sich im Verlauf der Oxidation ergeben (sh.5.2.2. Bindungsunterschiede des 2,3-DPG).

Wie später noch gezeigt wird, ergibt sich nur für die HbF_o-Oxidation ein von Ferri- bzw. Ferrocyanid praktisch unbeeinflußter 2,3-DPG-Effekt. Dieser nimmt in Luft und in O_2-Atmosphäre während der ersten Hälfte der Oxidation zu (k_1 und k_2 in Abb.21), während der zweiten Hälfte der Oxidation bleibt er unverändert (k_3 und k_4 in Abb.21).

In der ersten Hälfte der Oxidation macht sich die stärkere 2,3-DPG-Bindung an MetHb als an O_2Hb durch das oxidierte Häm bemerkbar, so daß die nun stärkere 2,3-DPG-Bindung eine Zunahme des 2,3-DPG-Effektes hervorruft.

Wie wir bereits weiter ober sahen, werden bei der Ferricyanidoxidation von O_2Hb zuerst die Nicht-α-Ketten oxidiert. Daß dies auch in Gegenwart von 2,3-DPG wahrscheinlich ist, zeigen die Befunde der Gruppe um Chien Ho (43,91,103), die in Gegenwart von 2,3-DPG für die α Ketten eine höhere Ligandenaffinität als für die ß Ketten beschreiben. Olson und Gibson (122) fanden, daß organisches Phosphat den Unterschied in der Reaktivität mit Liganden (n-Butylisocyanid) zwischen den α-

und ß Ketten vergrößert. Das bedeutet, daß die ß Ketten in Gegenwart von 2,3-DPG (wie in Abwesenheit von 2,3-DPG) eine größere Reaktionsbereitschaft zeigen als die α Ketten, und somit auch deren vorrangige Oxidation zu erwarten ist. Ebenso vergößert nach MacQuarrie (104) und Hensley (80) IHP im MetHb den Unterschied in der Reaktivität mit Liganden zwischen den α Ketten und den ß Ketten: Durch IHP wird die Reaktivität der $ß^+$ Ketten im MetHb mit Liganden (N_3^-) um das 2 - 6-fach gesteigert, die der $α^+$ Ketten bleibt unverändert.

Auf eine vorrangige Oxidation der Nicht-α-Ketten durch Ferricyanid auch in Gegenwart von 2,3-DPG scheint die unveränderte 2,3-DPG-Bindung während der zweiten Hälfte der Oxidation hinzudeuten (HbF_o in Abb.21); die 2,3-DPG-Bindung und damit der 2,3-DPG-Effekt sollte sich nämlich, falls die α Ketten zuerst oxidiert würden, mit dem Oxidationsgrad der 2,3-DPG-bindenden Nicht-α-Ketten ($k_3 \rightarrow k_4$) ändern. Die unveränderte 2,3-DPG-Bindung in der zweiten Hälfte der Oxidation würde zugleich auch bedeuten, daß die Propagation konformationeller Änderungen von den α Ketten zu den Nicht-α-Ketten nur gering ist (sh. auch 5.2.7. Propagation konformationeller Änderungen zwischen den Untereinheiten).

5.2.5. Sigmoider Oxidationsverlauf bei pO_2 = 700 Torr

Die bereits an den Halbwertszeiten ablesbare Verminderung des 2,3-DPG-Effektes auf die Oxidationsgeschwindigkeit in O_2-Atmosphäre gegenüber in Luft betrifft hauptsächlich die Oxidationsgeschwindigkeit der Nicht-α-Ketten (Abb.21). Dies bezeugt lediglich, daß sich die reziproke Bindung von O_2 und 2,3-DPG an das Hb in erster Linie an den ß Ketten zeigt, die das 2,3-DPG binden, und nicht mehr an den oxidierten $ß^+$ Ketten.

Diese geringere Beschleunigung der initialen Nicht-α-Ketten-Oxidation durch 2,3-DPG bei pO_2 = 700 Torr einerseits und der unter diesen Bedingungen etwa gleichbleibende 2,3-DPG-Effekt auf die α Ketten andererseits, sozusagen der im Verlauf der Reaktion mehr zunehmende 2,3-DPG-Effekt in O_2-Atmosphäre als in Luft bewirkt die leicht sigmoide Form der Reaktionskurven in Gegenwart von 2,3-DPG bei pO_2 = 700 Torr in den Abb. 15b, 16b und 18b.

5.2.6. 2,3-DPG-Effekt auf die einzelnen Ketten (Perutz-Modell)

Die 2,3-DPG-Wirkung auf die Oxidation der α Ketten bei bereits oxidierten $ß^+$ Ketten läßt sich entsprechend den Perutz' schen Vorstellungen (129,130,131,132) durch die 2,3-DPG-bedingte Verlagerung des R⇌T-Gleichgewichtes im tetrameren MetHb erklären. Durch die Bindung von 2,3-DPG an die $ß^+$ Ketten werden diese mehr in der tertiären t-Form gehalten, das einen verstärkten Hang der Quartärstruktur nach T (Desoxystruktur) bedingt, und somit auch für die noch nicht oxidierten α Ketten eine verminderte O_2-Affinität bewirkt, d.h. die Oxidation beschleunigt.

5.2.7. Propagation konformationeller Änderungen zwischen den Untereinheiten

Maeda et al. konnten die Propagation von Konformationsänderungen in Halb-Cyanmet-Hybrid-Hämoglobinen von den α Ketten zu den ß Ketten zeigen (108,109). Sie fanden nämlich, daß die Desoxygenation der $\alpha_2(O_2)$ Ketten eines $\alpha_2(O_2)ß_2^+(CN)$-Hybrids in den $ß_2^+(CN)$ Ketten eine T-state-ähnliche Konformation bewirken. Diese Propagation von Konformationsänderungen wirkt sich bei der Ferricyanidoxidation von O_2Hb unter den hier gewählten Bedingungen in Gegenwart eines allosterischen Effektors nur gering aus:

Wenn die Propagation von Konformationsänderungen zwischen den Untereinheitenen ($\alpha \longrightarrow$ Nicht-α-Ketten) die Hb-Oxidation beeinflußt, so sollte die verminderte O_2-Konzentration in Luft gegenüber in O_2-Atmosphäre in der halb oxidierten Hb-Lösung die Konzentration der noch nicht oxidierten α Ketten in der tertiären t-Struktur erhöhen; die oxidierten Nicht-α^+-Ketten gingen infolge der konformationellen Propagation auch vermehrt in t über, so daß insgesamt die Zahl halboxidierter Hb-Moleküle, die sich im T-state befänden, zunähme, (O_2 allein vermag MetHb nicht zwischen R und T zu shiften). Diese Hb-Moleküle bänden 2,3-DPG besser, und es sollte sich somit ein deutlich gesteigerter 2,3-DPG-Effekt auf die Oxidation der α Ketten in Luft gegenüber in O_2-Atmosphäre zeigen. Die 2,3-DPG-Effekte auf die Oxidation der α Ketten im HbF_o (k_3 und k_4 in Abb.24) zeigen jedoch nur eine geringe Steigerung als Hinweis auf eine Propagation konformationeller Änderungen zwischen den Untereinheiten.

5.2.8. Einfluß des Redoxpotentials in Gegenwart von 2,3-DPG

Eine detailierte Beschreibung des Einflußes des Redoxpotentials auf die Ferricyanidoxidation von ligandiertem Hb läßt sich nicht geben, da es in der Literatur keine Redoxtitrationskurven entsprechender Hb/MetHb-Systeme unter den hier gewählten Bedingungen gibt. Es ist jedoch bekannt, daß die Zugabe von IHP zu HbA $E_{1/2}$ (Redoxpotential bei Halboxidation, S.56) um 37 mV auf ca. +184 mV ansteigen läßt (98), und daß 2,3-DPG das Redoxpotential von HbA ebenfalls erhöht (1). Hieraus sollte eine Verminderung der Oxidationsgeschwindigkeit in Gegenwart von 2,3-DPG resultieren, falls die Hb-Oxidation durch Ferricyanid überwiegend vom Redoxpotential beeinflußt würde.

Wie in Abwesenheit von 2,3-DPG ist auch in Gegenwart von 2,3-DPG bei der Ferricyanidoxidation von ligandiertem Hb keine solche alleinige Abhängigkeit vom Redoxpotential sichtbar (Tab.I).

5.3. Gleichartiger 2,3-DPG-Effekt auf die Ferricyanidoxidation von O_2HbA_1 und O_2HbF_o

Die Tatsache, daß 2,3-DPG einen etwa gleichgroßen 2,3-DPG-Effekt auf die Ferricyanidoxidation von O_2HbF_o als auf die von O_2HbA_1 zeigt (Tab.I), überrascht, da ja 2,3-DPG den p_{50} von HbA mehr beeinflußt als den von HbF_o (18,144), und auch ein größerer 2,3-DPG-Effekt auf die Autoxidation von O_2HbA_1 zu sehen ist als auf die Autoxidation von O_2HbF (Versmold et al. 1973 (157), Mansuri und Winterhalter 1974 (112)).

Eine Fehlmessung als Ursache dieser gleichartigen Befunde an O_2HbA_1 und O_2HbF_o dürfte ausgeschlossen sein, da ja im Kontrollexperiment mit O_2HbF_1, dessen p_{50} überhaupt nicht durch 2,3-DPG beeinflußt wird (49,145), tatsächlich auch kein Einfluß des 2,3-DPG auf die Oxidationskinetik zu sehen ist (Tab.I, Abb.4,8).

Unsere Befunde sagen also, daß der 2,3-DPG-Effekt auf den p_{50} sowie der 2,3-DPG-Effekt auf die Autoxidation nicht gleichzusetzen ist dem 2,3-DPG-Effekt auf die Hb-Oxidation durch Ferricyanid. Das unerwartete Verhalten des HbA_1 und des HbF_o gegenüber 2,3-DPG findet sich nur in Gegenwart von Ferricyanid. Daher ist dieses Verhalten in einer direkten und ursächlichen Beziehung zum Ferricyanid zu diskutieren.

Unter der Vorstellung, daß eine stärkere Bindung des 2,3-DPG immer einen größeren 2,3-DPG-Effekt bedingt, und daß man umgekehrt aus einem größeren 2,3-DPG-Effekt immer auf eine

stärkere 2,3-DPG-Bindung schließen darf, könnte eine Erklärung darin liegen, daß die verschiedenen, für 2,3-DPG aufgezeigten Bindungsorte an HbA_1 und HbF_o durch die Gegenwart von Ferricyanid eine Änderung ihrer Bindungskraft erfahren. Genauer gesagt hieße das, daß die Bindung des 2,3-DPG an das Hb nach Zugabe von Ferricyanid geschwächt wird, wenn das His H21(143)ß vorhanden ist.

Eine solche Schwächung ist denkbar, da das während der Oxidation aus Ferricyanid entstehende Ferrocyanid - wie auch das Ferricyanid selbst - zwar an das Hb gebunden wird (92), sein 2,3-DPG-ähnlicher Effekt aber im Vergleich zum 2,3-DPG-Effekt hinsichtlich der Ligandenbindung an das Hb bedeutend geringer ist (142). Aus der nur bei Vorhandensein des His H21(143)ß erfolgenden Schwächung der 2,3-DPG-Bindung nach Zugabe von Ferricyanid,bzw. Ferrocyanid folgt, daß in erster Linie das His H21(143)ß verantwortlich ist für den Einfluß des Ferricyanids, bzw. des Ferrocyanids. Somit würde also die Verminderung der O_2-Affinität des HbA_1 durch 2,3-DPG zum Teil wieder rückgängig gemacht durch die Gegenwart von Ferri- bzw. Ferrocyanid, d.h. die Ferricyanidoxidation von O_2HbA_1 würde durch 2,3-DPG weniger beschleunigt als es von der 2,3-DPG-Wirkung auf den p_{50} her zu erwarten ist. Entsprechend zeigt auch die Autoxidation von O_2HbA eine deutlich größere Beschleunigung durch 2,3-DPG als die Ferricyanidoxidation. Im HbF_o fehlt das His H21(143)ß (gegen das Ser H21 (143)γ ausgetauscht), und somit der die 2,3-DPG-Bindung schwächende Effekt des Ferri- bzw. Ferrocyanids; der Oxidationsablauf bei der Ferricyanidoxidation wäre demnach praktisch unbeeinflußt von Ferri- bzw. Ferrocyanid.

Tatsächlich entspricht beim HbF_o der 2,3-DPG-Effekt auf die Ferricyanidoxidation dem auf die Autoxidation (Beschleunigung bei der Autoxidation ca. um den Faktor 3,5 (157), bei der

Ferricyanidoxidation um den Faktor 3,2). Das Kontrollexperiment mit HbF_1 würde demnach auch besagen, daß auf die Ferricyanidoxidation von HbF_1 weder eine 2,3-DPG-Wirkung, noch ein Einfluß des Ferri- bzw. des Ferrocyanids zu sehen ist.

Da nun das Ferrocyanid hinsichtlich der Verdrängung des 2,3-DPG vom Hb wirksamer ist als das Ferricyanid (92), und die Konzentration des Ferrocyanids während der Reaktion zunimmt, sollte sich der 2,3-DPG-Effekt von HbA_1 im Vergleich zu dem des HbF_0 im Verlauf der Reaktion zunehmend vermindern. Diese zunehmende Verminderung ist in der Tat sowohl bei pO_2 = 140 Torr, als auch bei pO_2 = 700 Torr in Abb.21 deutlich erkennbar.

Diese hier vorgelegte Hypothese, die, wie wir bereits weiter oben betonten, das Redoxpotential vernachläßigt, bedarf jedoch noch der weiteren experimentellen Absicherung. Die Tatsache, daß man mit einer einfachen Versuchsanordnung und einer entsprechenden Auswertung brauchbare Ergebnisse erhält, zeigt auch, daß man mittels unkomplizierter Apparaturen durchaus noch Beiträge zur Erforschung der Struktur-Funktions-Beziehung biologischer Moleküle leisten kann.

5.4. Klinische Bedeutung der Ergebnisse

Die Oxidationskinetik von Hämoglobin zum Methämoglobin, mit anderen Worten das Gleichgewicht zwischen diesen beiden Substanzen, ist insofern von praktischer Bedeutung, als unter normalen Umständen im Erythrocyten eine stetige, spontane Bildung von MetHb erfolgt (133), das dann enzymatisch zum zweiwertigen Hb rückreduziert wird (89).

Die vorliegenden Ergebnisse erlauben allerdings keine direkten Rückschlüsse auf kinetische Vorgänge in der roten Blutzelle in vivo. Die Spontanoxidation des Blutfarbstoffes im Erythrocyten ist grundsätzlich mit der Ferricyanidoxidation nicht gleichzusetzen. Zudem gibt es auch keine toxische Methämoglobinämie bei der Ferricyanid-Vergiftung, da die Erythrocytenmembran impermeabel für Ferricyanid ist (95). Das Vergiftungsbild besteht vielmehr in einer Cyanid-Vergiftung (86) der mitochondrialen Atmung.

Auf der anderen Seite konnte die in dieser Arbeit für die Ferricyanidoxidation gezeigte Beschleunigung der MetHb-Bildung durch 2,3-DPG auch für die Autoxidation nachgewiesen werden (157,112). Wenn nun allosterische Effektoren, die im Erythrocyten in äquimolaren Konzentrationen zum Hb vorliegen, die MetHb-Bildung signifikant beschleunigen, so wäre theoretisch ein Einfluß auf die steady-state-Konzentration des MetHb im Erythrocyten, und damit auf die O_2-Transportfunktion des Blutes denkbar.

Diese steady-state-Konzentration des MetHb im Erythrocyten hängt ab von der Geschwindigkeit der MetHb-Bildung, also u. a. von der 2,3-DPG-Konzentration, und von der Geschwindigkeit der Rückreduktion. Unter normalen Bedingungen übersteigt die Reduktionskapazität im Erythrocyten den " Bedarf " etwa 250-fach (89), so daß sich eine Verdoppelung der MetHb-Bildung, wie sie in Gegenwart von 5 mM 2,3-DPG erfolgte, kaum auswirken sollte. Tatsächlich fehlen auch im Blut erhöhte MetHb-Konzentrationen bei Kindern mit beträchtlichen cyanotischen Herzfehlern (82), bei denen die Hb-Oxidation begünstigt wird durch eine verminderte O_2-Sättigung des Blutes und einen adaptiv erhöhten 2,3-DPG-Spiegel (160).

Anders sind die Verhältnisse, wenn die MetHb-Reduktion im Erythrocyten eingeschränkt ist, wie bei der hereditären Methämoglobinämie (NADH-MetHb-Reduktase-Defekt), bei der

zugleich die 2,3-DPG-Konzentration im Erythrocyten erhöht ist (158). Hier sollte eine 2,3-DPG bedingte höhere Oxidationsrate des Blutfarbstoffs die MetHb-Konzentration im Erythrocyten steigern.

In der Tat konnte ein MetHb-Gehalt von 47 % am gesamten Blutfarbstoff bei einem einjährigen Kind mit hereditärer Methämoglobinämie gezeigt werden (156), dessen 2,3-DPG auf das 1,7-fache der Norm erhöht war. Ob aber zu diesem erhöhten MetHb-Gehalt des Blutes wirklich die 2,3-DPG bedingte raschere Oxidation des Hb neben der verminderten MetHb-Reduktion beiträgt, kann durch die vorliegenden Untersuchungen der Oxidation des Hb durch Ferricyanid nicht entschieden werden. Die Problematik der Übertragbarkeit der vorliegenden Untersuchungen in vitro auf die Verhältnisse im Erythrocyten in vivo ist auch deshalb eingeschränkt, weil die Reduktionsvorgänge bei der Rückumwandlung des MetHb zum funktionstüchtigen zweiwertigen Blutfarbstoff nicht in allen Erythrocyten gleichmäßig vor sich gehen, sondern einen individuellen Kippcharakter zeigen (100): Die einzelnen Erythrocyten reduzieren nach von Erythrocyt zu Erythrocyt unterschiedlichen langen, nicht näher untersuchten " Wartezeiten " in relativ kurzer Zeit ihr gesamtes MetHb (Elutionsmethode nach Kleihauer und Betke zur Darstellung von MetHb in den Erythrocyten eines Blutausstriches (99)). Dies zeigt, daß das Reduktions-Oxidations-Gleichgewicht in vivo, innerhalb des Erythrocyten, wesentlicher komplexer ist als der hier an Hb-Lösungen untersuchte Oxidationsvorgang.

VI. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der Untersuchung des Ablaufes der Oxidation von normalem adultem (HbA_1) und fetalem (HbF_o und HbF_1) Hämoglobin durch Ferricyanid bei einem pO_2 von 140 Torr (Luft) und von 700 Torr (O_2-Atmosphäre), sowie mit dem Einfluß des allosterischen Effektors 2,3-DPG auf diese Kinetiken.

Mit Hilfe der graphischen Auswertung wird das Hb-Molekül zunächst als eine Einheit betrachtet. Eine Berücksichtigung von Eigenschaften der einzelnen Ketten erfolgt dann durch die Auswertung der Oxidation nach einem 4-Stufen-Modell.

Graphisch zeigt sich bei keiner Bedingung eine Reaktion erster oder zweiter Ordnung (Abb.3 - 11), was eine gleichmäßige Oxidation der Häme ausschließt. Die unterschiedlichen Hämoglobine werden durch Ferricyanid in O_2-Atmosphäre langsamer oxidiert als in Luft, wobei sich eine zunehmende Oxidationsgeschwindigkeit in der Reihenfolge $HbA_1 < HbF_o < HbF_1$ zeigt (Tab.I). In Gegenwart von 2,3-DPG wird die Oxidation von HbA_1 und HbF_o etwa in gleichem Ausmaß beschleunigt, Oxidation von HbF_1 praktisch nicht; in Luft ist die Beschleunigung der Oxidation durch 2,3-DPG größer als in O_2-Atmosphäre.

Nun ist bei der Ferricyanid-Oxidation ligandierter Hämoglobine nach Connant (54), Roughton (141) und Betke (35) der eigentlichen Oxidation die Gleichgewichtsreaktion $O_2Hb \rightleftharpoons O_2 + DHb$ (sh. S.24) vorgelagert, aus der dann das DHb unmittelbar wegoxidiert wird. Dementsprechend ergibt sich aus der Verschiebung dieses Gleichgwichtes zur Seite des O_2Hb

durch die höhere O_2-Konzentration bei pO_2 = 700 Torr eine langsamere Oxidationsgeschwindigkeit als bei pO_2 = 140 Torr. Die in der Reihenfolge $HbA_1 > HbF_o > HbF_1$ fallende O_2-Affinität (in Abwesenheit von 2,3-DPG) (49) begünstigt zunehmend die Seite des DHb im vorgeschalteten Gleichgewicht $O_2Hb \rightleftharpoons O_2$ + DHb und bedingt damit die in dieser Reihenfolge zunehmende Oxidationsgeschwindigkeit. Diese ergibt sich auch aus kinetischen Befunden von Betke über die im Vergleich zu O_2HbA schnellere O_2-Dissoziation des O_2HbF (34).

Die Beschleunigung der Ferricyanidoxidation von HbA_1 und HbF_o durch 2,3-DPG (Tab.I, Abb.3 - 11) entsteht in derselben Weise, da 2,3-DPG die O_2-Affinität der Hämoglobine vermindert (145) und auch die O_2-Dissoziation steigert (19).

Von den 2,3-DPG-Effekten auf den p_{50} (18) oder auf die Autoxidation (157) her wäre bei HbA_1 ein größerer 2,3-DPG-Effekt zu erwarten als bei HbF_o; er ist jedoch bei der Ferricyanid-Oxidation annähernd gleich groß. Da nun das während der Reaktion entstehende Ferrocyanid mit dem Hb wie ein schwaches 2,3-DPG-Analog zu reagieren vermag (in geringerem Ausmaß auch das Ferricyanid (92)), könnte eine Erklärung darin liegen, daß die Bindung des 2,3-DPG an das Hb nach Zugabe von Ferricyanid geschwächt wird, wenn das His HC21(143)ß vorhanden ist. Im HbA_1 würde der 2,3-DPG-Effekt durch Ferri- bzw. Ferrocyanid vermindert. beim HbF_o (His HC21(143)ß gegen ein Ser ausgetauscht) wäre der Oxidationsablauf praktisch unbeeinflußt von Ferri- bzw. Ferrocyanid; in der Tat wird die Autoxidation und die Ferricyanidoxidation von HbF_o durch 2,3-DPG in annähernd gleichem Ausmaß beschleunigt.

Das Kontrollexperiment mit HbF_1 (Abb.4,8, Tab.I) zeigt im Gegensatz zu HbA_1 und HbF_o keinen allosterischen 2,3-DPG-Effekt, sondern nur eine geringe Beschleunigung durch die zusätzliche Ionenstärke (Tab.I, Abb.6,10).

Die geringere 2,3-DPG-Wirkung in O_2-Atmosphäre gegenüber in Luft bestätigt die von Benesch und Benesch gefundene reziproke Bindung von O_2 und 2,3-DPG an humanes Hb (26): Die erhöhte O_2-Konzentration vermindert die Bindung von 2,3-DPG an das Hb.

Die Auswertung der Oxidationskinetiken mit einem 4-Stufen-Modell, unter Ausschluß einer Rückreaktion, modifiziert nach Adair (sh.Punkt 3.4.,S.40), ergibt Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten (RG-Konstanten), die der Oxidation der einzelnen Häme entsprechen (Tab.II, Abb.19,23).Die gefundenen Muster an RG-Konstanten legen unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Eigenschaften der einzelnen Ketten den Schluß einer bevorzugten Oxidation der Nicht-α-Ketten nahe: Die RG-Konstanten k_3 und k_4 sind für alle Hämoglobine ähnlich und dürften der Oxidation der α Ketten entsprechen, die dem HbA_1, HbF_o und HbF_1 gemeinsam sind, während die sich deutlich unterscheidenden RG-Konstanten k_1 und k_2 der Oxidation der Nicht-α-Ketten, also der ß-, γ- und γ^{1}Val-acetyl-Ketten der drei Hämoglobine entsprächen (Abb.23). Diese Deutung der bevorzugten Oxidation der Nicht-α-Ketten wird gestützt durch Befunde über die Heterogenität der einzelnen Ketten (50,94, 118,120,121,122,124,148,150), die besagen, daß ein Ligand im intakten Tetramer schneller von den Nicht-α-Ketten abdissoziiert als von den α Ketten. Demnach würden durch Ferricyanid zuerst die Ketten oxidiert, die als erste ihren Oxidationsschutz , nämlich den Sauerstoff, verlören.

Hierzu muß die von Mansuri und Winterhalter gefundene vorrangige Oxidation der α Ketten bei der Autoxidation (111) nicht im Widerspruch stehen, da die Autoxidation eher ein statischer Vorgang ist, für den die kinetischen Eigenschaften (schnellere Dissoziation der ligandierten ß Ketten) der einzelnen Ketten von geringerer Bedeutung sind als deren sta-

tische Eigenschaften (z.B. Redoxpotential, das die α Kettenoxidation begünstigt).

Für die Ferricyanidoxidation gilt dies umgekehrt: Ein Einfluß einer statischen Eigenschaft wie des Redoxpotentials ist unter keiner experimentellen Bedingung erkennbar, während die kinetischen Eigenschaften den Reaktionsablauf bestimmen.

Der gleichbleibende 2,3-DPG-Effekt in der zweiten Hälfte der HbF_o-Oxidation (k_4 im Vergleich zu k_3 in Abb.21) zeigt, daß zu diesem Zeitpunkt die Nicht-α-Ketten bereits oxidiert sind, daß also die Nicht-α-Ketten durch Ferricyanid auch in Gegenwart von 2,3-DPG zuerst oxidiert werden. Dies wird auch nahegelegt durch Befunde über die Heterogenität der einzelnen Ketten in Gegenwart von organischem Phosphat (43,91,103,122).

Die Beschleunigung der Oxidation der α Ketten durch 2,3-DPG bei bereits oxidierten β^+- bzw. γ^+ Ketten (k_3 und k_4 von HbA_1 und HbF_o in Abb.21) läßt sich entsprechend den Perutz'schen Vorstellungen (129,130,132,131) durch die 2,3-DPG bedingte Verlagerung der R⇌T-Gleichgewichtes im tetrameren MetHb nach T erklären; hieraus folgt für die noch nicht oxidierten α Ketten eine verminderte O_2-Affinität, die zu deren beschleunigter Oxidation führt.

Die drastische Verminderung des 2,3-DPG-Effektes auf die Oxidationsgeschwindigkeit in O_2-Atmosphäre gegenüber in Luft (t/2 in Tab.I) betrifft hauptsächlich die Oxidation der Nicht-α-Ketten (k_1 und k_2 in Abb.21), während sich für die α Ketten keine nennenswerte Verminderung ergibt. Dieser sozusagen im Verlaufe der Reaktion mehr zunehmende 2,3-DPG-Effekt in O_2-Atmosphäre als in Luft bewirkt eine leicht sigmoide Form der Reaktionsverläufe in Gegenwart von 2,3-DPG bei pO_2 = 700 Torr (Abb.15b,16b,18b).

Rückblickend läßt sich also sagen, daß die auffallendsten Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen, unter ihrem molekular-biologischem Gesichtspunkt betrachtet, der Hinweis auf

(a) die vorrangige Oxidation der Nicht-α-Ketten durch Ferricyanid von normalem adultem und fetalem humanem Hämoglobin in Gegenwart und in Abwesenheit des allosterischen Effektors 2,3-DPG, und

(b) der im Gegensatz zur Autoxidation gleichartige 2,3-DPG-Effekt auf die Ferricyanidoxidation von O_2HbA_1 und O_2HbF_o, der wohl zurückzuführen ist auf

(c) eine in Gegenwart von Ferro- bzw. Ferricyanid durch Bindungskonkurrenz verminderte 2,3-DPG-Wirkung auf die Ferricyanidoxidation von adultem Hämoglobin

sind.

Unter dem klinischen Gesichtspunkt betrachtet bedeutet dies, daß von den vorliegenden Untersuchungen in vitro nicht direkt auf die Verhältnisse im Erythrocyten in vivo geschlossen werden kann; es kann also nicht entschieden werden, ob zu dem hohen MetHb-Gehalt des Blutes bei einem Kind mit hereditärer Methämoglobinämie (156) neben der verminderten MetHb-Reduktion zusätzlich noch beiträgt eine 2,3-DPG bedingte raschere Oxidation des Hb im Erytzrocyten.

VII. L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

1. ABOUL-HOSN,W., LEPANTO,P.B., TAYLOR,J.F.: Effects of 2,3-diphosphoglycerate and p-mercuribenzoate on the oxidation-reduction potential of hemoglobin. Fed.Proc. 29, 731 (1970).

2. ABRAHAM,E.C., TAYLOR,J.F.: Oxidation-reduction potentials of α, β, γ subunits of human hemoglobins. Fed.Proc. 31, 832 (1972).

3. ADAIR,G.S., BARCROFT,J., BOCK,A.V.: The identity of haemoglobin in human beings. J.Physiol.(London) 55, 332-338 (1921).

4. ADAIR,G.S.: The hemoglobin system. VI. The oxygen dissociation curve of hemoglobin. J.Biol.Chem. 63, 529-545 (1925).

5. ADAMS,M.L., SCHUSTER,T.M.: Phosphate-dependent spectroscopic changes in liganded hemoglobin. Biochem.Biophys.Res. Comm. 58, 525-531 (1974).

6. ANDERSON,L.: Intermediate structure of normal haemogobin: Methaemoglobin in the deoxy quarternary conformation. J.Mol. Biol. 79, 495-606 (1973).

7. ANTONINI,E., WYMAN,J., BRUNORI,M., BUCCI,E., FRONTICELLI,C., ROSSI-FANELLI,A.: Studies on the relations between molecular and functional properties of hemoglobin. IV. The Bohr effect in human hemoglobin measured by proton binding. J.Biol.Chem. 238, 2950-2957 (1963).

8. ANTONINI,E., WYMAN,J., BRUNORI,M., TAYLOR,J.F., ROSSI-FANELLI, A., CAPUTO,A.: Studies on the oxidation-reduction potentials of heme proteins. I. Human hemoglobin. J.Biol.Chem. 293, 907-912 (1964).

9. ANTONINI,E., BRUNORI,M., WYMAN,J.: Studies on the oxidation-resuction potentials of heme proteins. IV. The kinetics of oxidation of hemoglobin and myoglobin by ferricyanide. Biochemistry 4, 545-551 (1965).

10. ANTONINI,E., BUCCI,E., FRONTICELLI,C., WYMAN,J., ROSSI-FANELLI,A.: The properties and interactions of the isolated α and β chains of human haemoglobin. III. Observations on the equilibria and kinetics of the reactions with gases. J.Mol.Biol. 12, 375-384 (1965).

11. ANTONINI,E.: Hemoglobin and its reactions with ligands. The alpha-beta dimer appears to be the important unit in hemoglobin function. Science 158, 1417-1425 (1967).

12. ANTONINI,E., BRUNORI,M.: Hemoglobin and myoglobin in their reactions with ligands. North-Holland Publishing Co., Amsterdam-London 1971.

13. ARNONE,A.: X-ray diffraction study of binding of 2,3-diphosphoglycerate to human deoxyhemoglobin. Nature 237, 146-149 (1972).

14. BANERJEE,R., CASSOLY,R.: Preparation and properties of the isolated α and ß chains of human hemoglobin in the ferri state. J.Mol.Biol. 42, 337-349 (1969).

15. BARNIKOL,W.K.R., THEWS,G.: Zur Dissoziation des Human-Hämoglobins. Pflügers Arch.ges.Physiol. 309, 224-231 (1969).

16. BARNIKOL,W.K.R., THEWS,G.: Zur Interpretation der O_2-Bindungskurve des Human-Hämoglobins. Pflügers Arch.ges.Physiol. 309, 232-249 (1969).

17. BATEMAN,H.: The solution of a system of differential equations occuring in the theory of radio-active transformations. Proc. Camb.phil.Soc. 15, 423-427 (1910).

18. BAUER,Ch., LUDWIG,I., LUDWIG,M.: Different effects of 2,3-Diphosphoglycerate and adenosine triphosphate on the oxygen affinity of adult and foetal human haemoglobin. Life Sci. 7, 1339-1343 (1968).

19. BAUER,C., KLOCKE,R.A., KAMP,D., FORSTER,R.E.: Effect of 2,3-diphosphoglycerate and H^+ on the reaction of O_2 and hemoglobin. Amer.J.Physiol. 224, 838-847 (1973).

20. BAUER,C.: Binding of 2,3-diphosphoglycerate to haemoglobin valency hybrids. Nat.New Biol. 242, 208-209 (1973).

21. BAUER,Ch.: On the respiratory function of hemoglobin. Rev. Physiol.Biochem.Pharmacol. 70, 1-31 (1974).

22. BEHLKE,J., LAMPE,J., SCHELER,W.: Zum Elektrolyt- und Liganden-einfluß auf die Quartärstruktur des menschlichen Methämoglobins. Acta biol.med.germ. 24, 431-444 (1970).

23. BENESCH,R.E., BENESCH,R., MACDUFF,G.: Subunit exchange and ligand binding: A new hypothesis for the mechanism of oxygenation of hemoglobin. Proc.Nat.Acad.Sci.U.S. 54, 535-542 (1965).

24. BENESCH,R., BENESCH,R.E., TYUMA,I.: Subunit exchange and ligand binding,II. The mechanism of the allosteric effect in hemoglobin. Proc.Nat.Acad.Sci.U.S. 56, 1268-1274 (1966).

25. BENESCH,R., BENESCH,R.E.: The effect of organic phosphates from the human erythrocyte on the allosteric properties of hemoglobin. Biochem.Biophys.Res.Comm. 26, 162-167 (1967).

26. BENESCH,R., BENESCH,R.E., YU,C.I.: Reciprocal binding of oxygen and diphosphoglycerate by human hemoglobin. Biochem. 59, 526-532 (1967).

27. BENESCH,R.E., BENESCH,R., YU,C.I.: The oxygenation of hemoglobin in the presence of 2,3-diphosphoglycerate. Effect of temperature, pH, ionic strength, and hemoglobin concentration. Biochem. 8, 2567-2571 (1969).

28. BENESCH.R.E., BENESCH,R.: The mechanism of interaction of red cell organic phosphates with hemoglobin. Adv.Prot.Chem. 28, 211-237 (1975).

29. BENESCH,R., BENESCH,R.E., YUNG,S., EDALJI,R.: Hemoglobin covalently bridged across the polyphosphate binding site. Biochem.Biophys.Res.Comm. 63, 1123-1129 (1975).

30. BENESCH,R.E., IKEDA,S., BENESCH,R.: Reaction of haptoglobin with hemoglobin covalently cross-linked between the αß dimers. J.Biol.Chem. 251, 465-470 (1976).

31. BERGER,H., JÄNIG,G.-R., GERBER,G., RUCKPAUL,K., RAPOPORT,S. M.: Interaction of haemoglobin with ions. Interactions among magnesium, adenosine 5'-triphosphate, 2,3-bisphosphoglycerate, and oxygenated and deoxygenated human haemoglobin under simulated intracellular conditions. Eur.J.Biochem. 38, 553-562 (1973).

32. BETKE,K., SAVELSBERG,W.: Stufenphotometrische Hämoglobinbestimmung mittels Cyanhämiglobin. Biochem.Z. 320, 431- (1950).

33. BETKE,K.: Vergleichende Messung der Oxydationsgeschwindigkeit von fetalem und Erwachsenen-Hämoglobin zu Hämiglobin durch Kaliumferricyanid. Naturwiss. 39, 481-482 (1952).

34. BETKE,K.: Vergleichende Untersuchung der Reduktion und der Sauerstoffdissoziation bei fetalem und Erwachsenen-Blutfarbstoff. Klin.Wschr. 31, 573-574 (1953).

35. BETKE,K.: Der menschliche rote Blutfarbstoff bei Fetus und reifem Organismus. Eigenschaften, Differenzen und ihre klinische Bedeutung. Springer-Verlag, Berlin·Göttingen·Heidelberg 1954.

36. BETKE,K., GREINACHER,I., HECKER,F.: Oxydation menschlicher und tierischer Oxyhämoglobine durch Kaliumferricyanid. Arch. exper.Path.u.Pharm. 229, 207-219 (1956).

37. BETKE,K., SCHOLZ,P.: Vergleichende Untersuchung der Oxydation von Oxyhämoglobin Neugeborener und Erwachsener durch Kaliumferricyanid bei verschiedener Sauerstoffspannung. Naturwiss. 45, 88 (1958).

38. BLANCK,J., SCHELER,W.: Reaktionskinetische Untersuchungen zur Frage einer Hämin-Hämin-Wechselwirkung in Methämoglobinen. Acta biol.med.german. 17, 821-825 (1966).

39. BLANCK,J., SCHELER,W.: Untersuchungen zur Stuktur von Methämoglobinkomplexen: Gleichgwichte von Grenzformen unterschiedlicher Elektronenkonfiguration. Acta biol.med.german. 25, 29-39 (1970).

40. BOHR,Ch., HASSELBALCH,K., KROGH,A.: Ueber einen in biologischer Beziehung wichtigen Einfluß, den die Kohlensäurespannung des Blutes auf dessen Sauerstoffbindung übt. Scand. Arch.Physiol. 16, 402-412 (1904).

41. BOLTON,W., PERUTZ,M.F.: Three dimensional fourier synthesis of horse deoxyhaemoglobin at 2,8 Å resolution. Nature 228, 551-552 (1970).

42. BRAUNITZER,G., GEHRING-MÜLLER,R., HILSCHMANN,N., HILSE,K., HOBOM,G., RUDLOFF,V., WITTMANN-LIEBOLD,B.: Die Konstitution des normalen adulten Humanhämoglobins. Pflügers Arch.ges.Physiol. 325, 283-286 (1961).

43. BREEN,J.J., BERTOLI,D.A., DADOK,J., HO,Ch.: Proton magnetic resonance studies of human adult hemoglobin in water. Biophys.Chem. 2, 49-52 (1974).

44. BROOKS,J.: The oxidation of haemoglobin to methaemoglobin by oxygen. II. The relation between the rate of oxidation and the partial pressure of oxygen. Proc.roy.Soc.B 118, 560-577 (1935).

45. BROWN,W.D., MEBINE,L.B.: Autoxidation of oxymyoglobins. J. Biol.Chem. 244, 6696-6701 (1969).

46. BULL,C., FISHER,R.G., HOFFMAN,B.M.: Manganese hemoglobin: Allosteric effects in redox and ligation equilibria. Biochem. Biophys.Res.Comm. 59, 140-145 (1974).

47. BULL,C., HOFFMAN,B.M.: Redox equilibria of liganded forms of methemoglobin. Proc.Nat.Acad.Sci.USA 72, 3382-2286 (1975).

48. BUNN,F.H., JANDL,J.H.: Exchange of heme among hemoglobin molecule. Proc.Nat.Acad.Sci.USA 56, 974-978 (1966).

49. BUNN,H.F., BRIEHL,R.W.: The interaction of 2,3-diphosphoglycerate with various human hemoglobins. J.Clin.Invest. 49, 1088-1095 (1970).

50. CASSOLY,R., GIBSON,Q.H.: The kinetics of ligand binding to hemoglobin valency hybrids and the effect of anions. J.Biol. Chem. 247, 7332-7341 (1972).

51. CAUGHEY,W.S., WALLACE,W.J., VOLPE,J.A., O'KEEFFE,D.H., MAXWELL,J.C., BARLOW,C.H.: The binding and reduction of O_2 by hemeproteins. Fed.Proc. 33, 1247 (1974).

52. CHANUTIN,A., CURNISH,R.R.: Effect of organic and inorganic phosphates on the oxygen equilibrium of human erythrocytes. Arch.Biochem.Biophys. 121, 96-102 (1967).

53. CHANUTIN,A., HERMANN,E.: The interaction of organic and inorganic phosphates with hemoglobin. Arch.Biochem.Biophys. 131, 180-184 (1969).

54. CONNANT,J.B.: An electrochemical study of hemoglobin. J.Biol. Chem. 57, 401-414 (1923).

55. DAVIS, D.G., CHARACHE,S., HO,C.: Nuclear magnetic resonance studies of hemoglobins, III. Evidence for the nonequivalence of α- and ß-chains in azide derivatives of methemoglobins. Proc.Nat.Acad.Sci.USA 63, 1403-1409 (1969).

56. DEATHERAGE,J.F., LOE,R.S., ANDERSON,C.M., MOFFAT,K.: Structure of cyanide methemoglobin. J.Mol.Biol. 104, 687-706 (1976).

57. DEATHERAGE,J.F., LOE,R.S., MOFFAT,K.: Structure of fluoride methemoglobin. J.Mol.Biol. 104, 723-728 (1976).

58. DICKINSON,L.C., CHIEN,J.C.W.: Comparative biological chemistry of cobalt hemoglobin. J.Biol.Chem. 248, 5005-5011 (1973).

59. DUHM,J., GERLACH,E.: Metabolism and function of 2,3-diphosphoglycerate in red blood cells. In: Greenwald,T.J., Jamieson,G. A.(eds.), The human red cell in vitro, Grune & Stratton, 1974.

60. EDELSTEIN,S.J., REHMAR,M.J., OLSON,J.S., GIBSON,Q.H.: Functional aspects of the subunit association-dissociation equilibria of hemoglobin. J.Biol.Chem. 245, 4372-4381 (1970).

61. EDELSTEIN,S.J., GIBSON,Q.H.; The effect of functional differences in the α and ß chains in the cooperativity of the oxidation-reduction reaction of hemoglobin. J.Biol.Chem. 250, 961-965 (1975).

62. ERICSON,A., de VERDIER,C.-H.: A modified method for the determination of 2,3-diphosphoglycerate in erythrocytes. Scand. J.clin.Lab.Invest. 29, 85-90 (1972).

63. EVELYN,K.A., MALLOY,H.T.: Mikrodetermination of oxyhemoglobin, methemoglobin and sulfhemoglobin in single ample of blood. J.Biol.Chem. 126, 655 (1938).

64. FERRY,R.M., GREEN,A.A.: Studies in the chemistry od hemoglobin. III. The equilibrium between oxygen and hemoglobin and its relation to change hydrogen ion activity. J.Biol. Chem. 81, 175-203 (1929).

65. FLOHÉ,L.: Potentiometrische Untersuchungen des menschlichen Hämoglobin-F-Methämoglobin-F-Systems. Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 348, 953-962 (1967).

66. FÜHR,J.: Hämoglobinbestimmungnach der international anerkannten Standardmethode als Zyanhämiglobin in jedem Laboratorium. Therapie der Gegenwart 8, 905-912 (1963).

67. GARBY,L., de VERDIER,C.-H.: Binding of 2,3-diphosphoglycerate and adenosine triphosphate to human haemoglobin A. Eur.J.Biochem. 10, 110-115 (1969).

68. GEORGE,P., STRATMANN,C.J.: The oxidation of myoglobin to metmyoglobin by oxygen. Biochem.J. 51, 103-108 (1952).

69. GEYER,D., LEMBERG,R.,: The use of ferricyanide for the preparation of methemoglobin. Biochim.Biophys.Acta 229, 284-285 (1971).

70. GIBSON,Q.H., PARKHURST,L.J., GERACI,G.: The reaction of methemoglobin with some ligands. J.Biol.Chem. 244, 4668-4676 (1969).

71. GIBSON,Q.H.: Organic phosphates and ligand binding in hemoglobin. Biochem.Biophys.Res.Comm. 40, 1319-1324 (1970).

72. GRAY,R., GIBSON,Q.H.: The effect of inositol hexaphosphate of the kinetics of CO and O_2 binding by human hemoglobin. J.Biol.Chem. 246, 7168-7174 (1971).

73. GREENWALD,I.: A new type of phosphoric acid compound isolated from blood, with some remarks on the effect of substitution of l-glyceric acid. J.Biol.Chem. 63, 339-349 (1925).

74. GUIDOTTI,G., CRAIG,L.C.: Dialysis studies, VIII. The behavior of solutes which associate. Proc.Nat.Acad.Sci.USA 50, 46-54 (1963).

75. GUIDOTTI,G., KONIGSBERG,W., CRAIG,L.C.: On the dissociation of normal adult human hemoglobin. Proc.Nat.Acad.Sci.USA 50, 774-782 (1963).

76. GUIDOTTI,G.: Studies on the chemistry of hemoglobin. II. The effect of salts on the dissociation of hemglobin into subunits. J.Biol.Chem. 242, 3685-3697 (1967).

77. GUPTA,R.K., BENOVIC,J.L., ROSE,Z.B.: Location of the allosteric site for 2,3-biphosphoglycerate on human oxy- and deoxyhemoglobin as observed by magnetic resonance spectroscopy. J.Biol.Chem. 254, 8250 - 8255 (1979).

78. GUSTAVSON,T., de VERDIER,C.-H.: Binding of some phosphorylated intermediates to oxygenated and deoxygenated hemoglobin A. Acta biol.med.german. 30, 25 - 31 (1973).

78. HEIDNER,E.J., LADNER,R.C., PERUTZ,M.F.: Structure of horse carbonmonoxyhaemoglobin. J.Mol.Biol. 104, 707-722 (1976).

80. HENSLEY,P., EDELSTEIN,S.J., WHARTON,D.C., GIBSON,Q.H.: Conformation and spin state in methemoglobin. J.Biol.Chem. 250, 952-960 (1975).

81. HENSLEY,P., MOFFAT,K., EDELSTEIN,S.J.: Influence of inositol hexaphosphate binding on subunit dissociation in methemoglobin. J.Biol.Chem. 250, 9391-9396 (1975).

82. HESSENBRUCH,M.: Methämoglobinwerte in derNeugeborenenperiode mit besonderer Berücksichtigung von Cyanose, Ikterus und Austauschtransfusion. Inauguraldissertation, München 1972.

83. HILL,A.V.: The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves. J. Physiol.(London) 40, iv-vii (1910).

84. HOARD,J.L., HAMOR,M.J., HAMOR,T.A., CAUGHEY,W.S.: The crystal structure and molecular stereochemistry of methoxyiron (III) mesoporphyrin-IX dimethyl ester. J.Amer.Chem.Soc. 87, 2312-2319 (1965).

85. HOFFMAN,B.M., PETERING,D.H.: Zeroglobins: Oxygen-carrying cobalt-reconstituted hemoglobin and myoglobin. Proc.Nat.Acad. Sci.USA 67, 637-643 (1970).

86. HOLLEMAN,A.F., WIBERG,E.: Lehrbuch der anorganischen Chemie. Walter de Gruyter & Co, Berlin 1971, p.482.

87. HOLLAND,R.A.B.: Rate of O_2 dissociation from O_2Hb and relative combination rate of CO and O_2 in mammals at 37 °C. Respir.Physiol. 7, 30-42 (1969).

88. HUISMAN,T.H.J.: Studies on the heterogeneity of hemoglobin. XI. Chromatographic studies of intermediate forms of oxy- and ferrihemoglobin. Arch.Biochem.Biophys. 113, 427-434 (1966).

89. JAFFE,E.R., HSIEH,H.-S.: DPNH-Methemoglobin reductase deficiency and hereditary methemoglobinemia. Seminars in Hematology 8, 417-437 (1971).

90. JÄNIG,G.R., GERBER,G., RUCKPAUL,K., RAPOPORT,S., JUNG,F.: Interaction of haemoglobin with ions. Thermodynamic data on binding of adenosine triphosphate to methaemoglobin. Eur.J.Biochem. 17, 441-444 (1970).

91. JOHNSON,M.E., HO,C.: Effects of ligands and organic phosphates on functional properties of human hemoglobin. Biochem. 13, 3653-3661 (1974).

92. JUNG,F.: Persönliche Mitteilung 1976.

93. van KAMPEN,E.J., ZIJLSTRA,W.G.: Standardization of hemoglobinometry. II. The hemoglobincyanide method. Clin. Chim.Acta 6, 538-544 (1961).

94. KERNOHAN,J.C.: Kinetics of the reactions of two sheep hemoglobins with oxygen and carbon monoxide. J.Physiol. (London) 155, 580-588 (1961).

95. KIESE,M.: Methemoglobinemia: A comprehensive treatise. CRC-Press, Cleveland 1974, p. 56.

96. KIESE,M., SCHNEIDER,C.: Oxydation von Hämoglobin durch Sauerstoff. Biochem.Z. 362, 209-217 (1955).

97. KIKUCHI,G., SHUKUYA,R., SUZUKI,M., NAKAMURA,C.: On the mechanism of the activation of molecular oxygen by hemoglobin. J.Biochem. 42, 267-284 (1955).

98. KILMARTIN,J.V.: The interaction of inositol hexaphosphate with methemoglobin. Biochem.J. 133, 725-733 (1973).

99. KLEIHAUER,E., BETKE,K.: Elution procedure for the demonstration of methaemoglobin in red cells of human blood smears. Nature 199, 1196-1197 (1963).

100. KLEIHAUER,E., BETKE,K.: Das Verhalten des Blutfarbstoffs innerhalb individueller menschlicher Erythrocyten bei experimenteller Oxydation und enzymatischer Reduktion. Acta biol.med.german. Supplementband III, 161-166 (1964).

101. KNOWLES,F.C., MCDONALD,M.J., GIBSON,Q.H.: The origin of the Adam-Schuster difference spectrum of oxyhemoglobin. Biochem.Biophys.Res.Comm. 66, 556-563 (1975).

102. KOSHLAND,D.E., NEMETHY,G., FILMER,D.: Comparison of experimental binding data and theoratical models in proteins containing subunits. Biochem. 5, 365-385 (1966).

103. LINDSTROM,T.R., HO,C.: Functional nonequivalence of α and ß hemes in human adult hemoglobin. Proc.Nat.Acad.Sci. USA 69, 1707-1710 (1972).

104. LITTLE,R.G., IBERS,J.A.: Stereochemistry of cobalt porphyrins. III. The structure of 2,3,7,8,12,13,17,18-octaethylporphinato(1-methylimidazole)-cobalt(II). A model for deoxyhemoglobin. J.Amer.Chem.Soc. 96, 4452-4463 (1974).

105. MacQUARRIE,R.A., GIBSON,Q.H.: The effect of organic phosphates on methemoglobin.Fed.Proc. 30, 1151 (1971).

106. MacQUARRIE,R.A., GIBSON,Q.H.: Functional heterogeneity of the α and ß chains in the oxidation-reduction reaction of human hemoglobin. J.Biol.Chem. 246, 517-522 (1971).

107. MAEDA,T., HIROMI,K., OHNISHI,S.: A kinetic study on conformational change of deoxyhemoglobin induced by a group of effectors. Biochem.Biophys.Res.Comm. 38, 934-939 (1970).

108. MAEDA,T., OHNISHI,S.: Kinetic evidence for propagation of conformational changes in the α subunit to the ß subunit of hemoglobin. Biochem. 10, 1177-1180 (1971).

109. MAEDA,T., IMAI,K., YUMA,T.: Effects of 2,3-diphosphoglycerate on the oxygen equilibria of the half-cyanmet hybrid hemoglobins. Biochem. 11, 3685-3689 (1972).

110. MAHLER,H.R., Condes,L.A.: Biological Chemistry. Harper & Row Publ. New York, Evanston, San Francisco, London 1971 p.30.

111. MANSURI,A., WINTERHALTER,K.H.: Nonequivalence of chains in hemoglobin oxidation. Biochem. 12, 4946-4949 (1973).

112. MANSURI,A., WINTERHALTER,K.H.: Nonequivalence of chains in hemoglobin oxidation and oxygen binding. Effect of organic phosphates. Biochem. 13, 3311-3314 (1974).

113. MIRSKY,A.E., ANSON,M.L.: Sulfhydryl and disulfide groups of proteins. III.Sulfhydryl groups of native proteins-hemoglobin and the proteins of the crystalline lens. J.gen. Physiol. 19, 439-450 (1936).

114. MOFFAT,K., LOE,R.S., HOFFMAN,B.M.: The structure of metmanganoglobin. J.Mol.Biol. 104, 669-685 (1976).

115. MONOD,J., WYMAN,J., CHANGEUX,J.-P.: On the nature of allosteric transitions: A plaudible model. J.Mol.Biol. 12, 88-118 (1965).

116. MÜLLER,E.: Das Potential der Ferricyanid-Ferrocyanidelektrode. Z.phys.Chem. 88, 46-56 (1914).

117. NOBLE,R.W.: The effect of p-hydroxymercuribenzoate on the reactions of the isolated γ-chains of human hemoglobin with ligands. J.Biol.Chem. 246, 2972-2976 (1971).

118. OGATA,R.T., McCONNELL,H.M.: The binding of a spin-labeled triphosphate to hemoglobin. Cold Spring Harbor Symp.Quant. Biol. 36, 325-335 (1971).

119. OLSON,J.S., GIBSON,Q.H.: The reaction of n-butyl isocyanide with human hemoglobin. I. Determination of the kinetic parameters involves in the last step in ligand binding. J.Biol.Chem. 246, 5241-5253 (1971).

120. OLSON,J.S., ANDERSEN,M.E., GIBSON,Q.H.: The dissociation of the first oxygen molecule from some mammalian oxyhemoglobins. J.Biol.Chem. 246, 5919-5923 (1971).

121. OLSON,J.S., GIBSON,Q.H.: The reaction of n-butyl isocyanide with human hemoglobin. II. The ligand-binding properties of the α and β chains within deoxyhemoglobin. J.Biol.Chem. 247, 1713-1726 (1972).

122. OLSON,J.S., GIBSON,Q.H.: The effects of pH and anions on the properties of the α and β chains within human deoxyhemoglobin. J.Biol.Chem. 248, 1616-1622 (1973).

123. OLSON,J.S.: Binding of inositol hexaphosphate to human methemoglobin. J.Biol.Chem. 251, 447-458 (1976).

124. OLSON,J.S., BINGER,C.: The effect of lignad size and sereochemistry on the reactivity of the α and ß chains within henoglobin. Biochim.Biophys.Acta 434, 428-439 (1976).

125. PAULING,L.: The nature of the chemical bond. 3rd Ed., Cornell University Press, Ithaca, N.Y. 1960, pp.256-264.

126. PERUTZ,M.F., MUIRHEAD,H., COX,J.M., GOAMAN,L.C.G.: Three dimensional fourier synthesis of horse oxyhaemoglobin at 2.8 Å resolution: The atomic model. Nature 219, 131-139 (1968).

127. PERUTZ,M.F.: The hemoglobin molecule. Proc.Roy.Soc.B. 173, 113-140 (1969).

128. PERUTZ,M.F.: Stereochemistry of cooperative effects in hemoglobin. Nature (London) 228, 720-739 (1970).

129. PERUTZ,M.F., LADNER,J.E., SIMON,S.R., HO,C.: Influence of globin structure on the state of the heme. I. Human deoxyhemoglobin. Biochem. 13, 2163-2174 (1974).

130. PERUTZ,M.F., FERSHT,A.R., SIMON,S.R., ROBERTS,G.C.K.: Influence of globin structure on the state of the heme. II. Allosteric transition in methemoglobin. Biochem. 13, 2174-2186 (1974).

131. PERUTZ,M.F., HEIDNER,E.J., LADNER,J.E., BEETLESTONE,J.G., HO,C., SLADE,E.F.: Influence of globin structure on the state of the heme. III. Changes in heme spectra accompanying allosteric transitions in methemoglobin and their implications for heme-heme interaction. Biochem. 13, 2187-2200 (1974).

132. PERUTZ,M.F., KILMARTIN,J.V., NAGAI,K., SZABO,A., SIMON,S.R.: Influence of globin structure on the state of the heme. Ferrous low spin derivatives. Biochem. 15, 378-387 (1976).

133. PETERS,J.P., VAN SLYKE,D.D.: Quantitative clinical chemistry, Interpretations. Baillière, Tindall and Cox, London 1931, p.631.

134. RAPOPORT,S., GUEST,G.M.: Distribution of acid-soluble phosphorous in the blood cells of various vertebrates. J.Biol. Chem. 138, 269-282 (1941).

135. RAPOPORT,S., GERBER,G., RUCKPAUL,K., JÄNIG,G.-R., FRUNDER, H., JUNG,F.: Binding of multivalent anions to oxygenated hemoglobin and the role of the imidazole group. In: Oxygen affinity of haemoglobin and red cell acid base status..Rörth, M., Astrup,P.(eds.), Munksgaard, Copenhagen 1972, pp.147-155.

136. REISBERG,P., OLSON,J.S., PALMER,G.: Kinetic resolution of ligand binding to the α and ß chains within human hemoglobin. J.Biol.Chem. 251, 4379-4383 (1976).

137. REMMER,H.: Die Reaktion zwischen Globin und Ferricyanid. Biochem.Z. 330, 232-239 (1958).

138. REMMER,H., MEYER-WILMES,J.: Die Oxidation von Hämoglobin durch Ferricanid. Biochem.Z. 330, 218-231 (1958).

139. ROSSI-FANELLI,A., ANTONINI,E., CAPUTO,A.: Studies on the relations between molecular and functional properties of hemoglobin. II. The effect of salts on the oxygen equilibrium of human hemoglobin. J.Biol.Chem. 236, 397-400 (1961).

140. ROSSI-FANELLI, A., CAPUTO,A.: Hemoglobin and myoglobin. Adv. Prot.Chem. 19, 73-222 (1964).

141. ROUGHTON,F.J.W.: The kinetics of haemoglobin VI - The competition of carbon monoxide and oxygen with haemoglobin. Proc.Roy.Soc.B. 115, 473-495 (1934).

142. RUCKPAUL,K., REIN,H., RISTAU,O., JÄNIG,G.-R., JUNG,F.: Interaction of hemoglobin with ions. Allosteric effects of the binding of anions. Biochim.Biophys.Acta 236, 211-221 (1971).

143. SALHANY,J.M., MIZUKAMI,H., ELIOT,R.S.: The deoxygenation kinetic properties of human fetal hemoglobin: Effect of 2,3-diphosphoglycerate. Biochem.Biophys.Res.Comm. 45, 1350-1356 (1971).

144. SCHMIDT, zitiert nach: Budge,J.: Specielle Physiologie des Menschen. Buchdruckerei des Landes-Industrie-Comptoir, Weimar 1857, pp. 131 und 137.

145. SEIFERT,G.: Fetales Hämoglobin und 2,3-Diphosphoglycerat als determinierende Faktoren der O_2-Transportfunktion des Blutes im ersten Lebensjahr. Inauguraldissertation, München 1972.

146. SEYBERT,D.W., MOFFAT,K., GIBSON,Q.H.: Ligand binding properties of horse hemoglobins containing deutero- and mesoheme. J.Biol.Chem. 251, 45-52 (1976).

147. SIDWELL,A.E., MUNCH,R.H., BARRON,E.S.G., HOGNESS,T.R.: The salt effect on the hemoglobin-oxygen equilibrium. J.Biol. Chem. 123, 335-350 (1938).

148. SIRS,J.A.: The velocity constant, k_4, of the reaction Hb_4O_8 + CO, in sheep erythrocytes and dilute hemoglobin solutions. Biochim.Biophys.Acta 126, 19-27 (1966).

149. SROUJI,A.H., MACLEOD,R.M.: Demonstration and isolation of the hybrid hemoglobins $\alpha_2^A\beta^A\beta^C$ and $\alpha_2^A\beta^S\beta^C$. Biochim.Biophys. Acta 453, 15-25 (1976).

150. SUGITA,Y., BANNAI,S., YONETAMA,Y., NAKAMURA,T.: Noneqivalence of the α and ß chains in the oxygen dissociation from hybrid-heme hemoglobin. J.Biol.Chem. 247, 6092-6095 (1972).

151. TOMITA,S., ENOKI,Y., MOCHI,T., WATANABE,T.: The dissociation of human deoxyhemoglobin and mixed state hemoglobin into monomer. Biochim.Biophys.Acta 434, 44-50 (1976).

152. TYUMA,I., IMAI,K., SHIMIZU,K.: Effect of inositol hexaphosphate and other organic phosphates on the cooperativity of oxygen binding of human hemoglobins. Biochem.Biophys. Res.Comm. 44, 682-686 (1971).

153. TYUMA,I., IMAI,K., SHIMIZU,K.: Analysis of oxygen equilibrium of hemoglobin and control mechanism of organic phosphates. Biochem. 12, 1491-1498 (1973).

154. VERDIER de,C.-H., GARBY,L.: Low binding of 2,3-diphosphoglycerate to haemoglobin F. A contribution to the knowledge of the binding site and an explanation for the high oxygen affinity of foetal blood. Scand.J.clin.Lab.Invest. 23, 149-151 (1969).

155. VERSMOLD,H., BRAUSER,B., RIEGEL,K.: 2,3-diphosphoglycerate and tissue oxygen supply: spectrophotometric registration of cytochrome a oxidation in the intact organ as indicator of improved intracellular oxygenation. Proc.XIV Internat. Congr.Hematol., Sao Paulo, 1972, Abstr.Nr.50.

156. VERSMOLD,H., KOHNE,E., RIEGEL,K., BETKE,K., KLEIHAUER,E.: Oxygen carring function of blood in hereditary methemoglobinemia: ambivalent effects of 2,3-diphosphoglycerate. In: Gerlach,E., Moser,K., Wilmanns,W., Deutsch,E. (eds.), IInd Internat.Symp.Metabolism and Membrane Permeability of Erythrocytes, Thrombocytes and Leucocytes. Thieme, Stuttgart, 1973, pp.170-174.

157. VERSMOLD,H., HERKEL,N., RIEGEL,K., BETKE,K.: Oxidation kinetics of human oxyhemoglobins: Influence of 2,3-diphosphoglycerate. II. Autoxidation and oxidation by nitrite.Abh.Dtsch. Akad.Wiss.Berlin/DDR 1973, pp.309-313.

158. VERSMOLD,H., KOHNE,E., KLEIHAUER,E., RIEGEL,K.: Die Sauerstofftransportfunktion des Blutes bei der hereditären Methämoglobinämie. Die Rolle des 2,3-Diphosphoglycerats. Mschr. Kinderheilk. 121, 397-399 (1973).

159. VERSMOLD,H., BRAUSER,B., RIEGEL,K.P.: Influence of hemoglobin oxygen affinity on reduction state of cytochrome aa_3 in perfused liver. Adv.Exp.Med.Biol. 75, 145-150 (1976).

160. VERSMOLD,H.T., LINDERKAMP,O., DÖHLEMANN,C., RIEGEL,K.P.: Oxygen transport in congenital heart disease: Influence of fetal hemoglobin, red cell pH, and 2,3-diphosphoglycerate. Pediat.Res. 10, 566-570 (1976).

161. WEHINGER,H., ALEBOUYEH,M.: Densitometrisch-quantitative Bestimmung von Hämoglobin A_2 nach Mikrozonen-Elektrophorese auf Cellulose-Acetat-Folie. Klin.Wschr, 48, 701-703 (1970).

162. WEISS,J.: The autoxidation of ferrous ions in aqueous solution. Experientia 9, 61-62 (1953).

163. WEISS,J.J.: Nature of the iron-oxygen bond in oxyhaemoglobin. Nature 202, 83-84 (1964).

164. YAMAMOTO,T., PALMER,G., GILL,D., SALMEEN,I.T., RIMAI,L.: The valence and spin state of iron in oxyhemoglobin as inferred from resonance raman spectroscopy. J.Biol.Chem. 248, 5211-5213 (1973).

165. YONETANI,T., YAMAMOTO,H., KAYNE,F., WOODROW,G.: Equilibrium, kinetic and electron-paramagnetic-resonance studies of the reversible oxygenation of cobalt-sustituted myoglobins and haemoglobins. Biochem.Soc.Trans. 1, 44 (1973).

Abbildungen 3 - 11

Zeitlicher Verlauf der Methämoglobinbildung von chromatographisch isolierten Hämoglobinen (DEAE Sephadex A50) durch Kaliumferricyanid in Gegenwart und Abwesenheit von 5 mM 2,3-DPG. Dargestellt sind die gemittelten Kurven aus den entsprechenden Versuchen. Die Anzahl der Versuche (n) ist in Klammern angegeben. Die Streuungen innerhalb der Versuchsserien sind den Abbildungen 12 - 18 (Darstellung der Einzelversuche) zu entnehmen.

Experimentelle Bedingungen:

Hb : $1{,}0 \pm 0{,}023 \times 10^{-4}$ M (Häm)
$K_3Fe(CN)_6$/Häm : 2,5 (M/M)
2,3-DPG : 5 mM oder 2,3-DPG-frei ($< 10^{-7}$ M)
pH : 6,95 ± 0,015

0,1125 M Triäthanolamin-HCl-Puffer (TRAP-Puffer)
gemessen bei 578 nm
25°C
Gesamt-Ionenstärke μ : 0,114 M (ohne 2,3-DPG)
0,149 M (mit 5 mM 2,3-DPG)
0,149 M (mit 35 mM KCl)

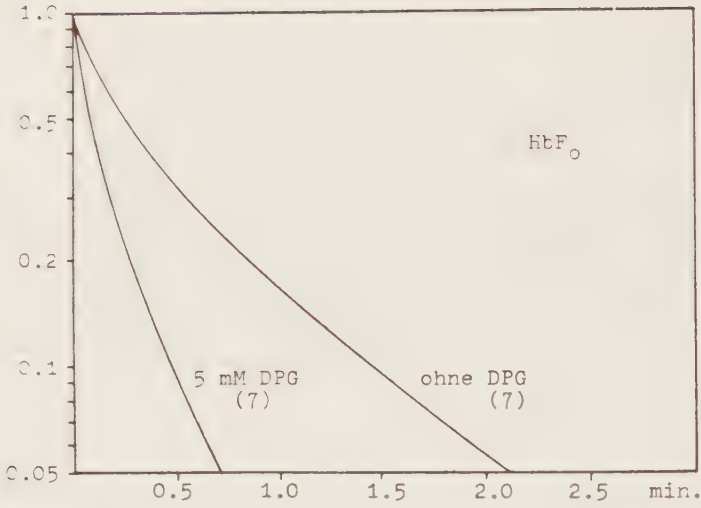


Abb.3

pO_2: 140 Torr

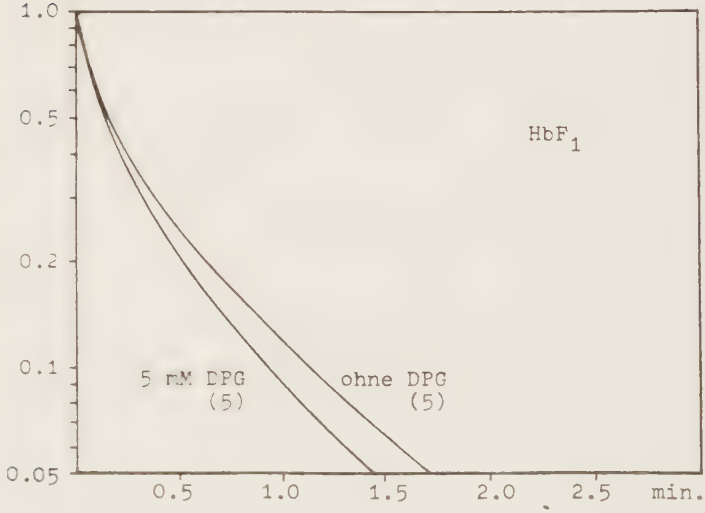


Abb.4

pO_2: 14o Torr

Vergleich der Oxidationskinetik von HbF_o (Abb.3) und HbF_1(Abb.4) durch Kaliumferricyanid.

Sonstige Versuchsbedingungen auf Seite 95.

Die einzeln gezeichneten Versuche befinden sich in den Abbildungen 13(HbF_o) und 14(HbF_1).

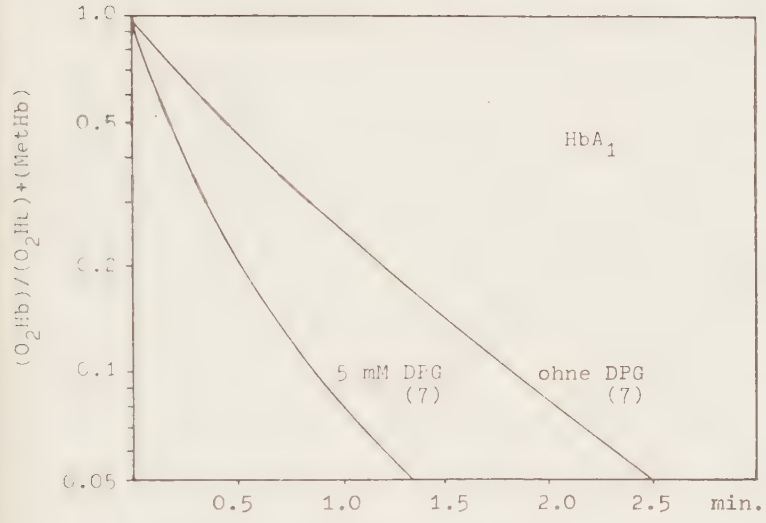


Abb.5

pO_2: 140 Torr

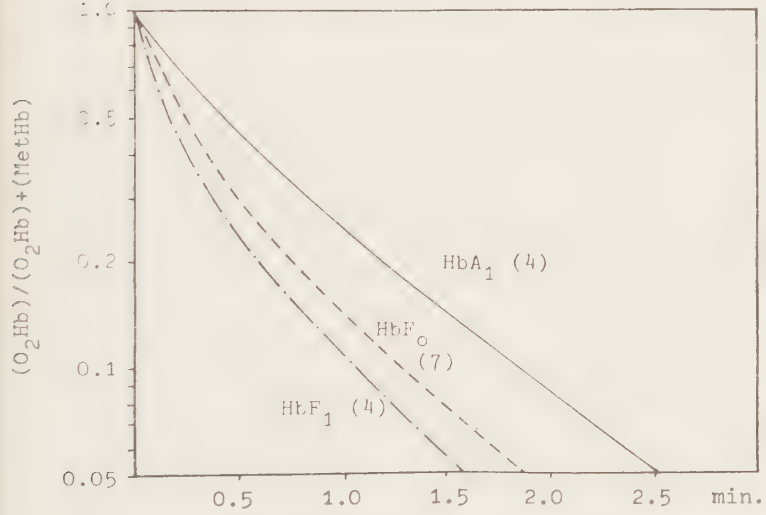


Abb.6

pO_2: 140 Torr

Abb.5: Oxidationskinetik von HbA_1 durch Kaliumferricyanid

Abb.6: Oxidationskinetik von HbA_1, HbF_o und HbF_1 durch Kaliumferricyanid in Gegenwart von 35 mM KCl (entsprechend einer Ionenstärke von 5 mM 2,3-DPG) in Luft.

Sonstige Versuchsbedingungen für Abb.5 und Abb.6 auf Seite 95.
Die einzeln gezeichneten Versuche befinden sich in den Abb.12a, 12b, bzw. 12c, 13c, 14c.

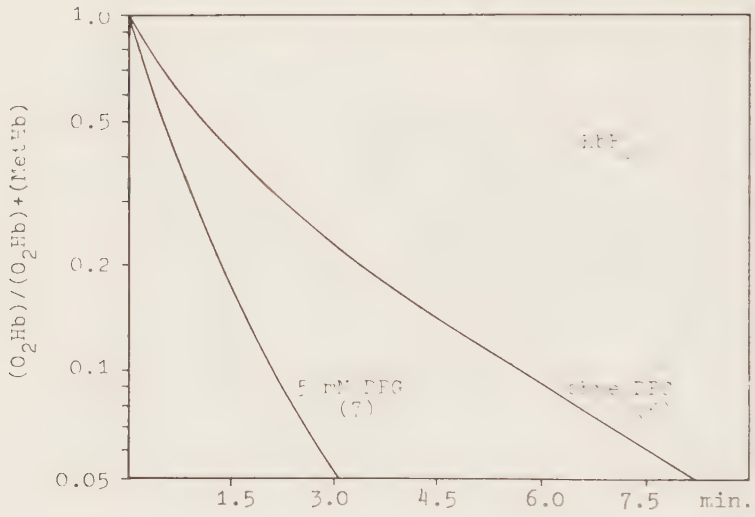


Abb.7

pO_2: 700 Torr

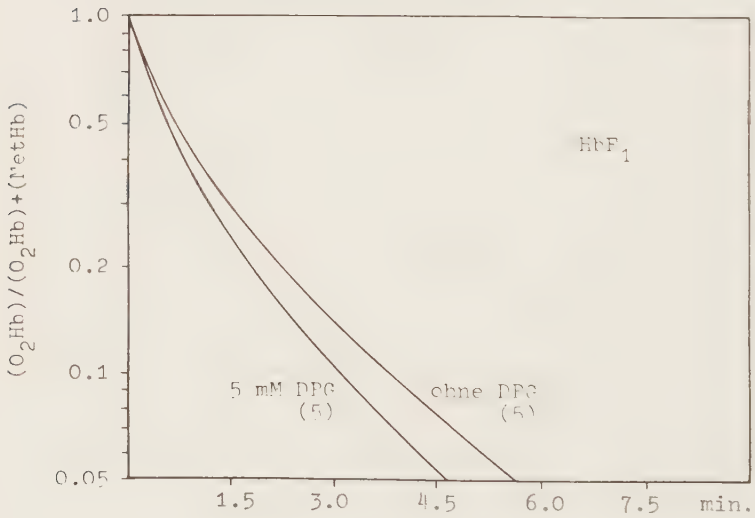


Abb.8

pO_2: 700 Torr

Vergleich der Oxidationskinetik von HbF_o (Abb.7) und HbF_1 (Abb.8) durch Kaliumferricyanid bei pO_2 = 700.

Sonstige Versuchsbedingungen auf Seite 95.
Die einzeln gezeichneten Versuche befinden sich in den Abbildungen 16 (HbF_o) und 17 (HbF_1).

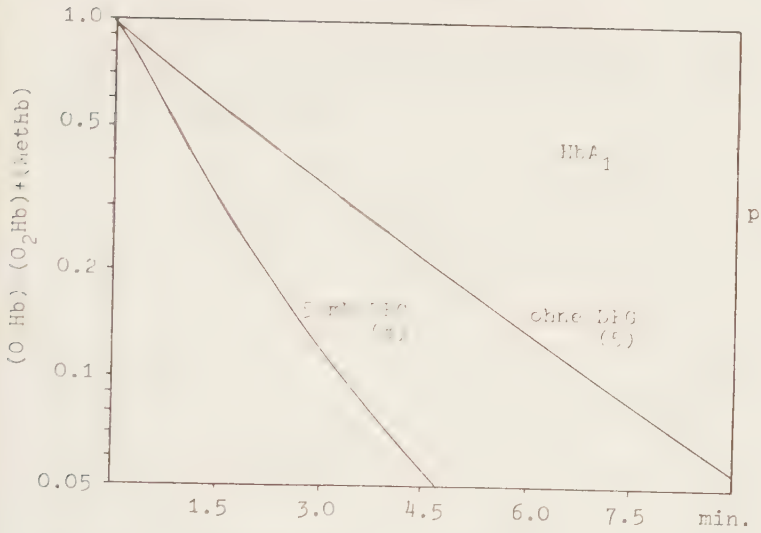


Abb.9

pO_2: 700 Torr

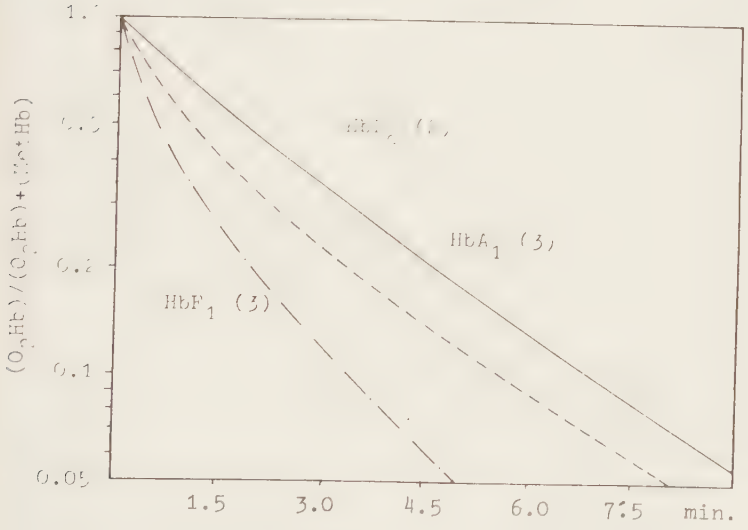


Abb.10

pO_2: 700 Torr

Abb.9: Oxidationskinetik von HbA_1 durch Kaliumferricyanid bei pO_2 = 700 Torr.

Abb.10: Oxidationskinetik von HbA_1, HbF_o und HbF_1 durch Kaliumferricyanid in Gegenwart von 35 mM KCl (entsprechend einer Ionenstärke von 5 mM 2,3-DPG) bei pO_2= 700 Torr.

Sonstige Versuchsbedingungen für Abb.9 und Abb.10 auf Seite 95.
Die einzeln gezeichneten Versuche befinden sich in den Abb.15a,15b, bzw. 15c, 16c, 17c.

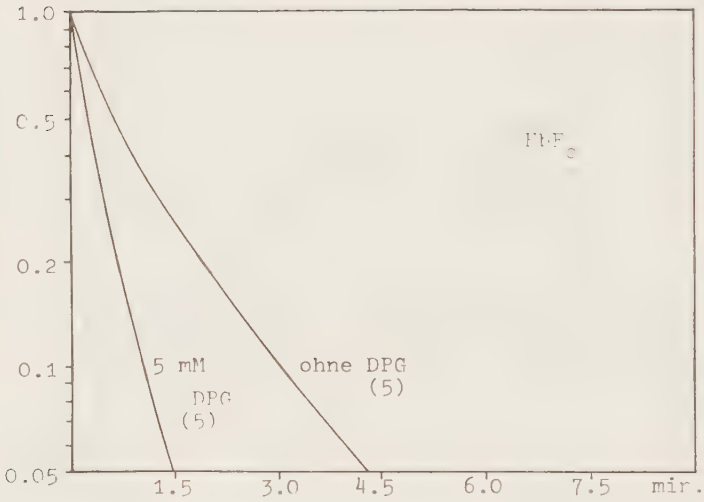


Abb.11

pO_2: 700 Torr

$\frac{K_3Fe(CN)_6}{Häm}$ = 4 ($\frac{M}{M}$

Ionenstärke μ:

Ø DPG : 0,1149

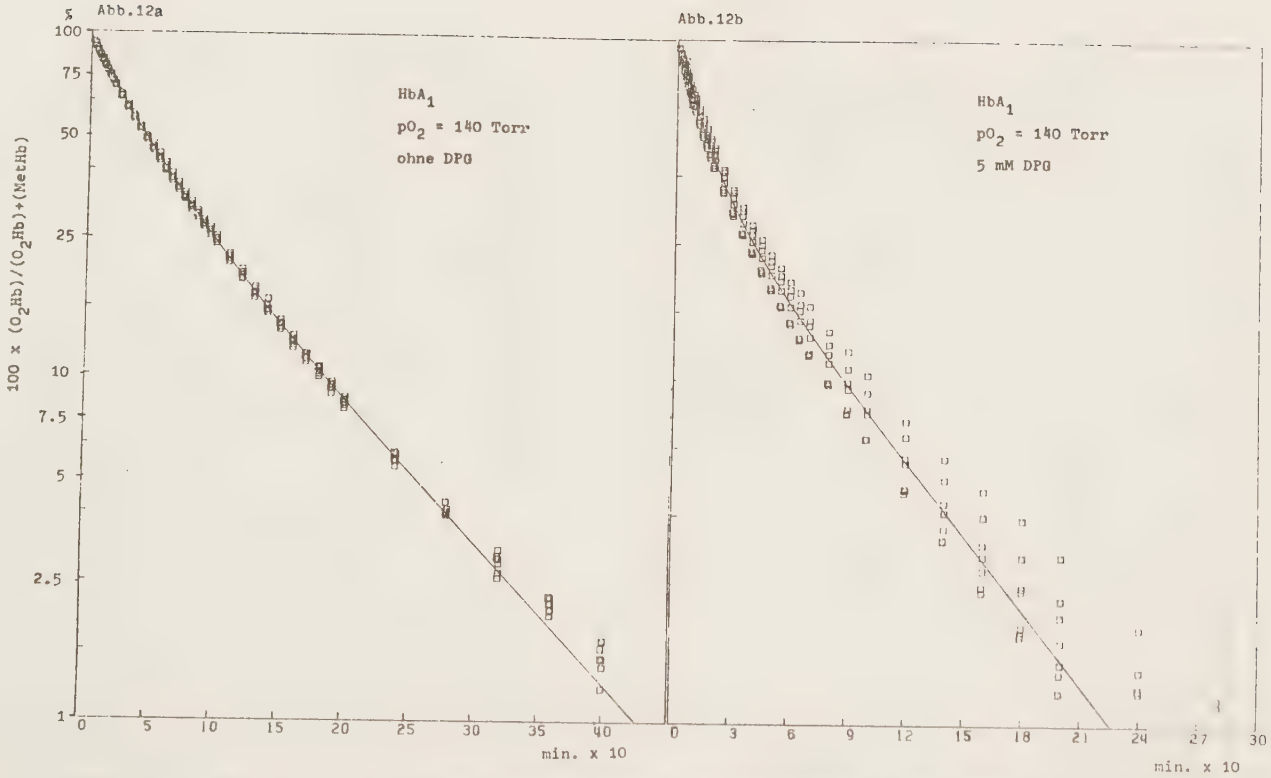
+ " : 0,1499

Oxidationskinetik von HbF_o bei einem molaren Kaliumferricyanid/Häm-Überschuß von 4,0 und einem pO_2 von 700 Torr.

Sonstige Versuchsbedingungen auf Seite 95.
Die einzeln gezeichneten Versuche befinden sich in den Abbildungen 18a und 18b.

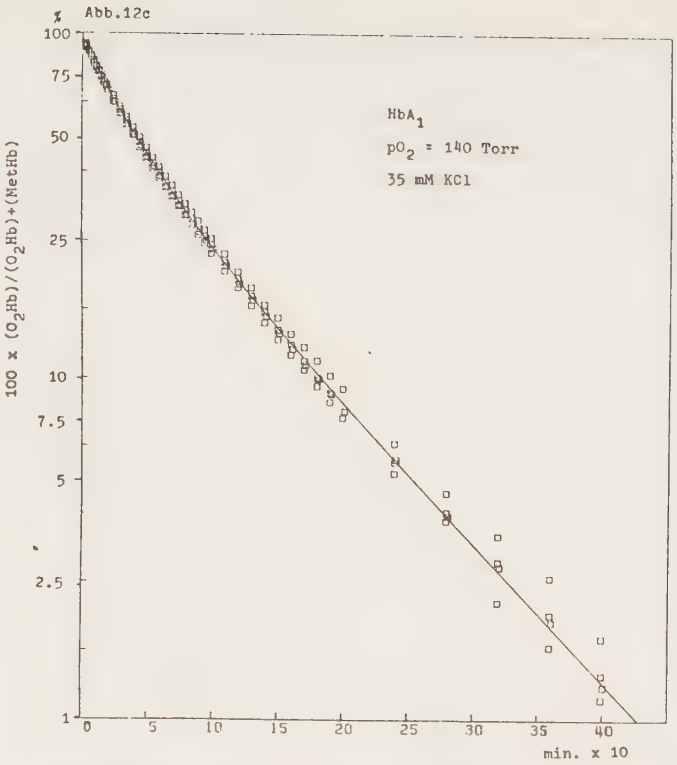
Bei den Abbildungen 12 - 18 sind die Zeitachsen jeweils so gewählt, daß die Streuung der Einzelversuche am deutlichsten zur Darstellung kommt.

Versuchsbedingungen siehe Seite 95.



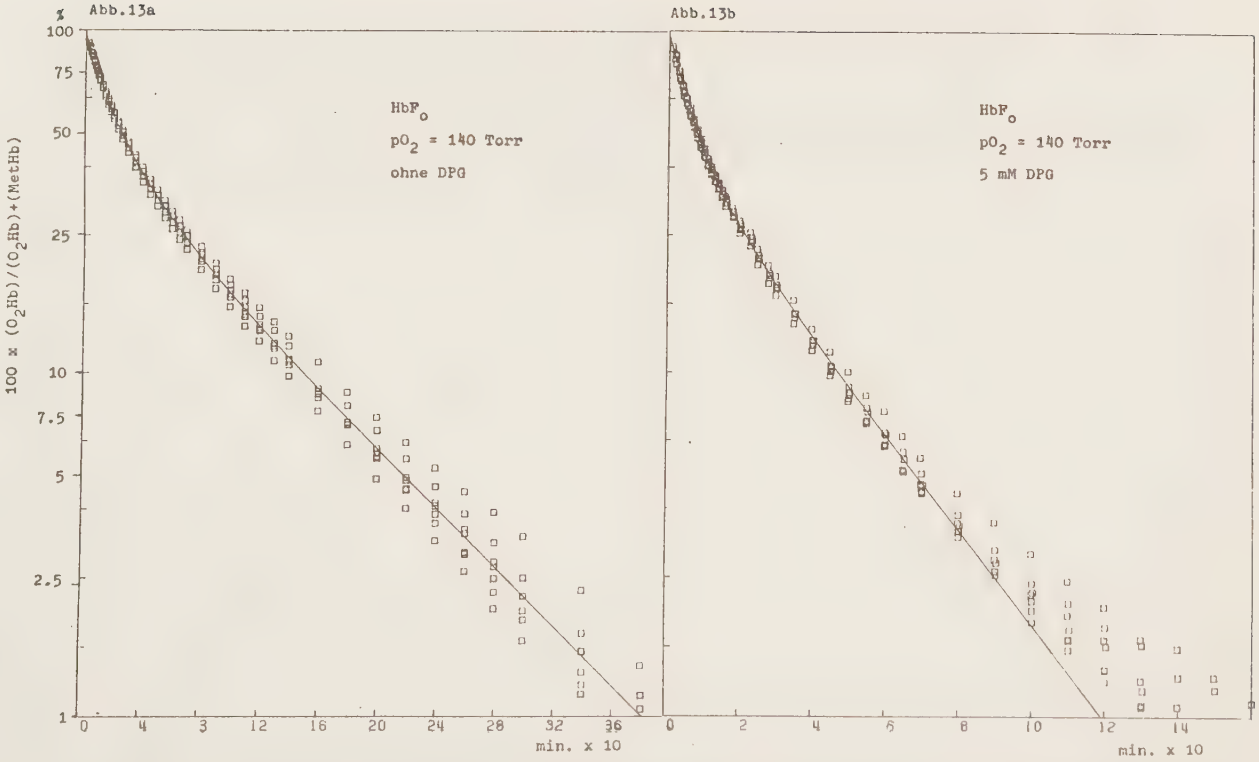
Darstellung der Einzelversuche und rechnerische Angleichung eines Reaktionsverlaufes an die beobachteten Punkte nach dem 4-Stufen-Modell (sh. S. 40) mit den in Tabelle II angegebenen Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten k_1 - k_4 (durchgezogene Linie).

Sonstige Bedingungen auf Seite 95 . Gemittelte Kurven auf Seite 97 .



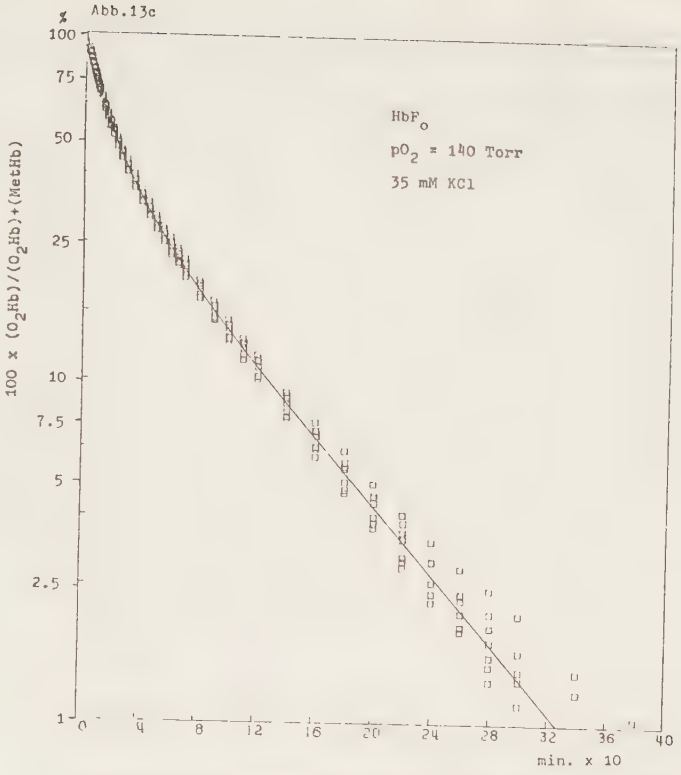
Darstellung der Einzelversuche und rechnerische Angleichung eines Reaktionsverlaufes an die beobachteten Punkte nach dem 4-Stufen-Modell (sh. S. 40) mit den in Tabelle II angegebenen Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten k_1- k_4 (durchgezogene Linie).

Sonstige Bedingungen auf Seite 95. Gemittelte Kurve auf Seite 97.



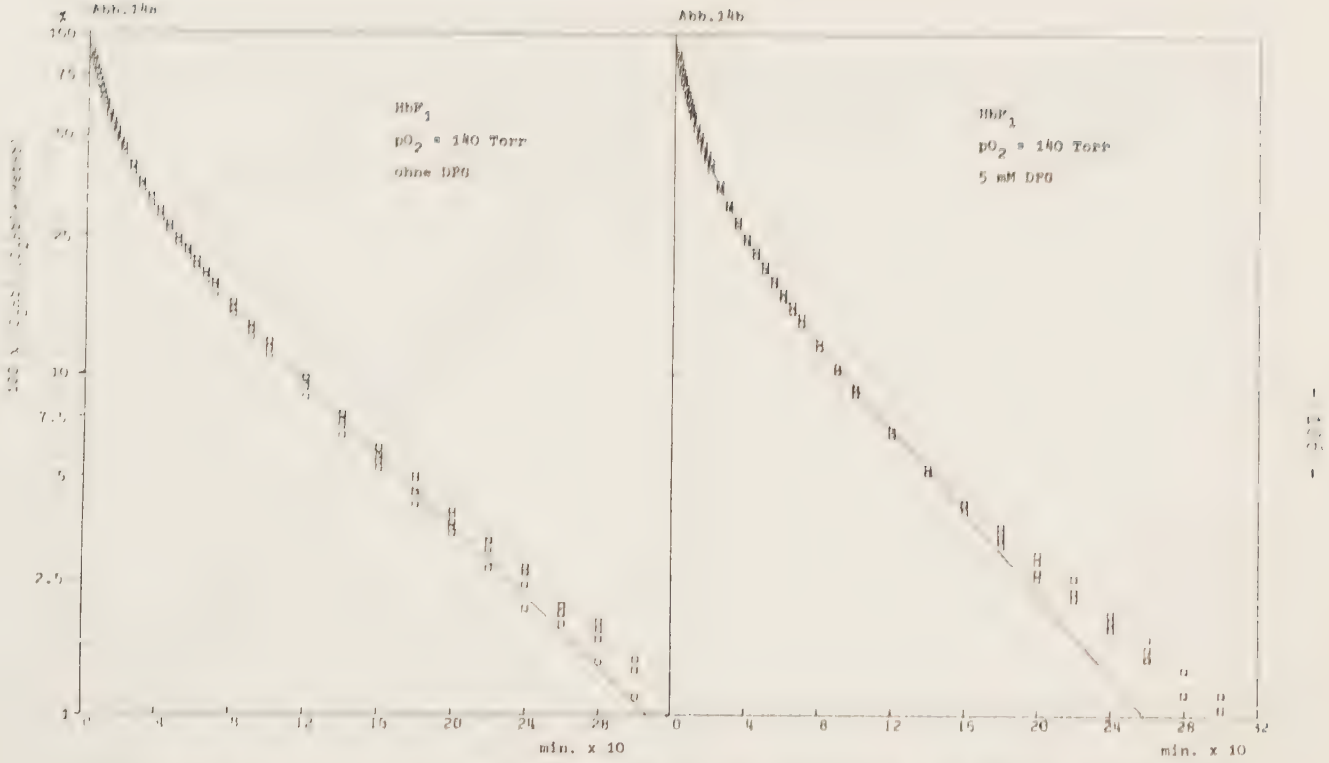
Darstellung der Einzelversuche und rechnerische Angleichung eines Reaktionsverlaufes an die beobachteten Punkte nach dem 4-Stufen-Modell (*sh. S. 40*) mit den in Tabelle II angegebenen Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten k_1- k_4 (durchgezogene Linie).

Sonstige Bedingungen auf Seite 95. Gemittelte Kurven auf Seite 96.



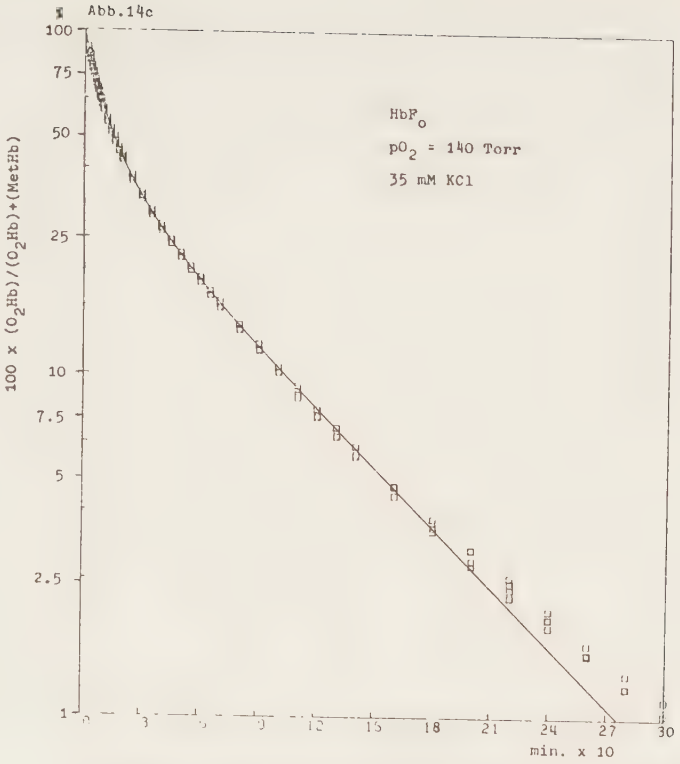
Darstellung der Einzelversuche und rechnerische Angleichung eines Reaktionsverlaufes an die beobachteten Punkte nach dem 4-Stufen-Modell (s. S 40) mit den in Tabelle II angegebenen Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten k_1- k_4 (durchgezogene Linie).

Sonstige Bedingungen auf Seite 95. Gemittelte Kurve auf Seite 97.



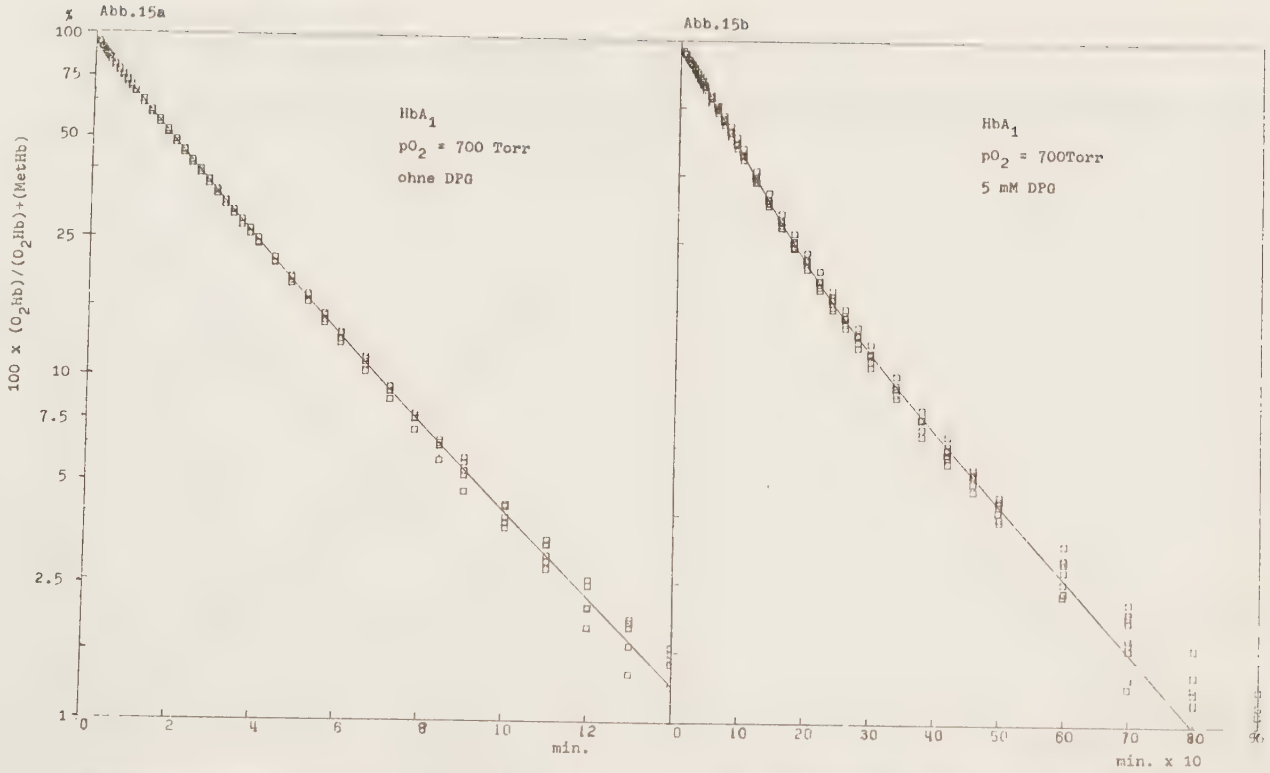
Darstellung der Einzelversuche und rechnerische Angleichung eines Reaktionsverlaufes an die beobachteten Punkte nach dem 4-Stufen-Modell (Abb. 14a, 14b) mit den in Tabelle II angegebenen Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten k_1- k_4 (durchgezogene Linie).

Sonstige Bedingungen auf Seite 95 . Gemittelte Kurven auf Seite 96 .



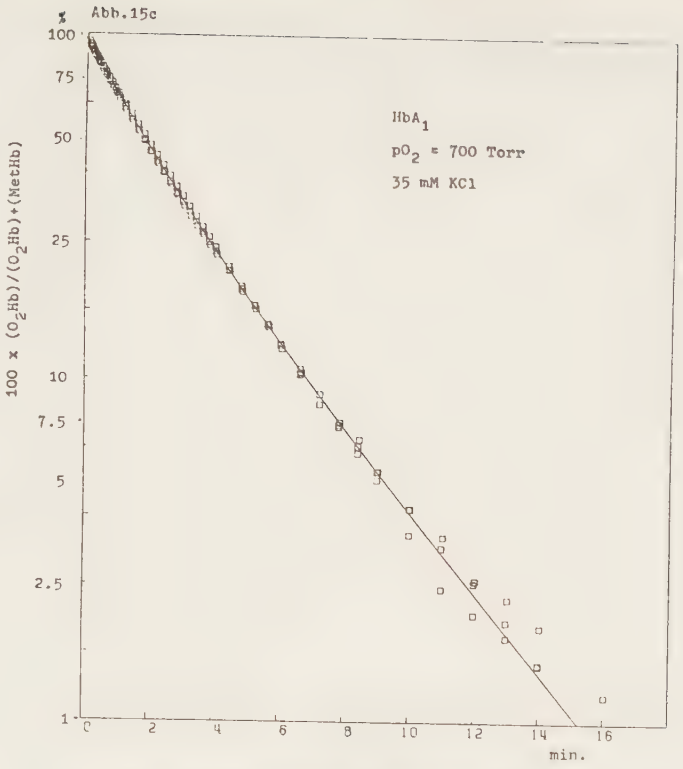
Darstellung der Einzelversuche und rechnerische Angleichung eines Reaktionsverlaufes an die beobachteten Punkte nach dem 4-Stufen-Modell (sh S 40) mit den in Tabelle II angegebenen Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten k_1- k_4 (durchgezogene Linie).

Sonstige Bedingungen auf Seite 95. Gemittelte Kurve auf Seite 97.



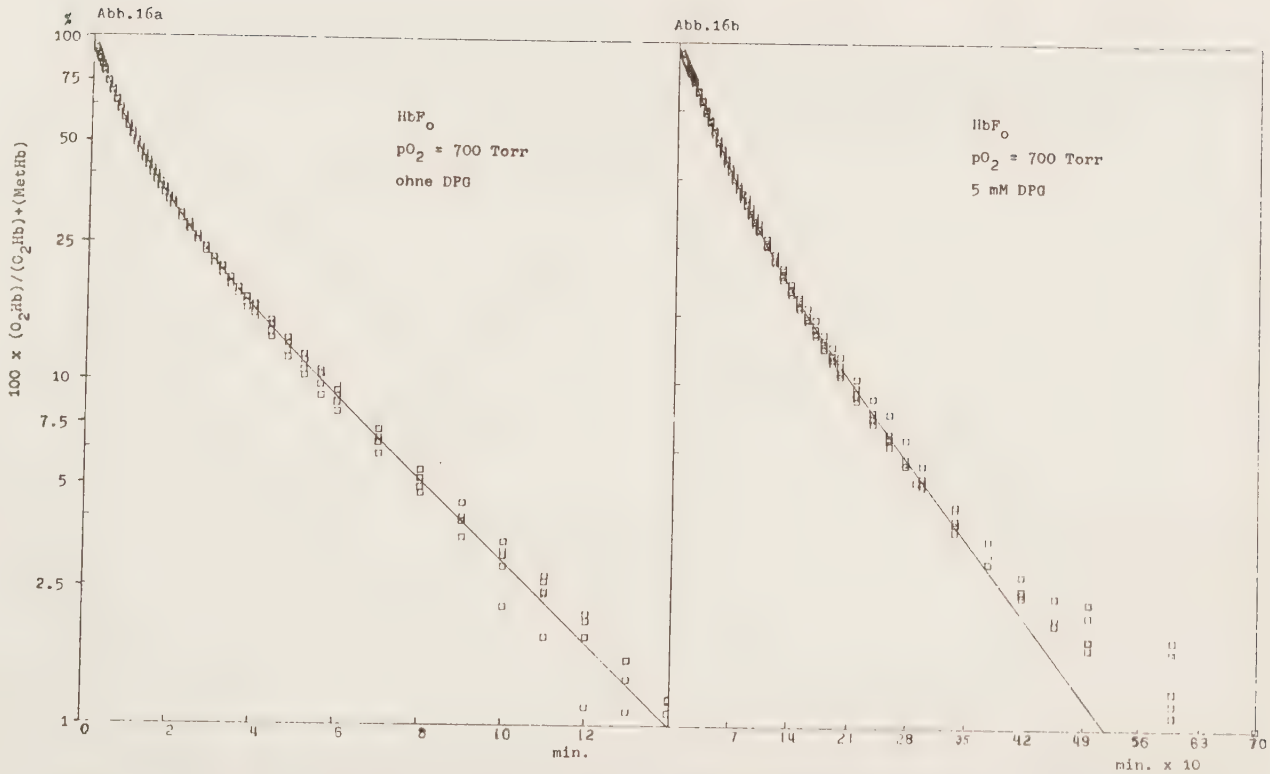
Darstellung der Einzelversuche und rechnerische Angleichung eines Reaktionsverlaufes an die beobachteten Punkte nach dem 4-Stufen-Modell (sh S.40) mit den in Tabelle II angegebenen Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten k_1 - k_4 (durchgezogene Linie).

Sonstige Bedingungen auf Seite 95. Gemittelte Kurven auf Seite 99.



Darstellung der Einzelversuche und rechnerische Angleichung eines Reaktionsverlaufes an die beobachteten Punkte nach dem 4-Stufen-Modell (s.h.S.40) mit den in Tabelle II angegebenen Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten k_1- k_4(durchgezogene Linie).

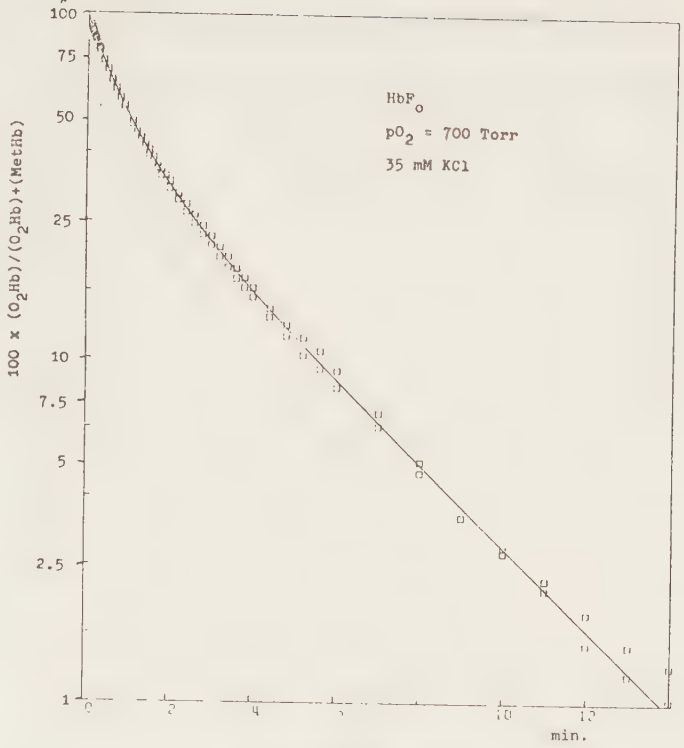
Sonstige Bedingungen auf Seite 95 . Gemittelte Kurven auf Seite 99 .



Darstellung der Einzelversuche und rechnerische Angleichung eines Reaktionsverlaufes an die beobachteten Punkte nach dem 4-Stufen-Modell (sh. S. 40) mit den in Tabelle II angegebenen Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten k_1 - k_4 (durchgezogene Linie).

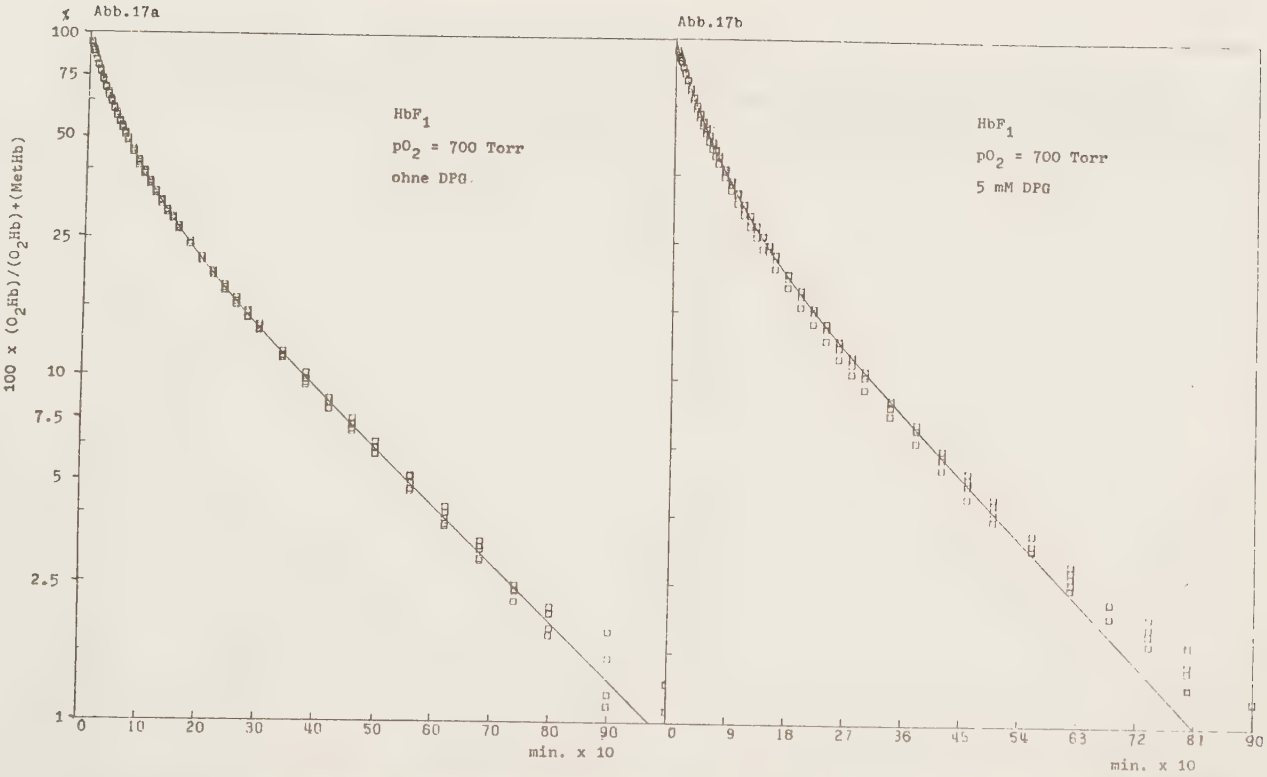
Sonstige Bedingungen auf Seite 95. Gemittelte Kurven auf Seite 98.

Abb.16c



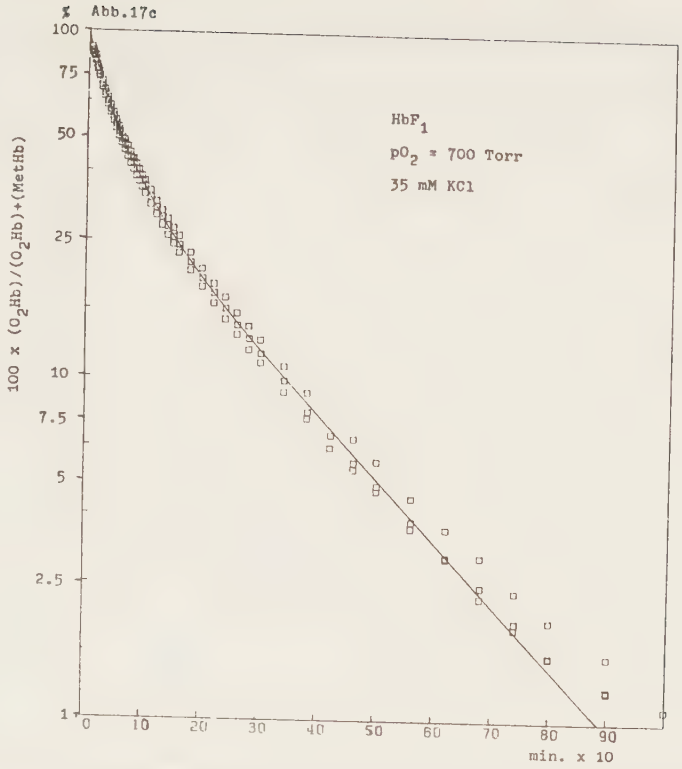
Darstellung der Einzelversuche und rechnerische Angleichung eines Reaktionsverlaufes an die beobachteten Punkte nach dem 4-Stufen-Modell (sh. S.40) mit den in Tabelle II angegebenen Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten k_1- k_4 (durchgezogene Linie).

Sonstige Bedingungen auf Seite 95. Gemittelte Kurve auf Seite 99.



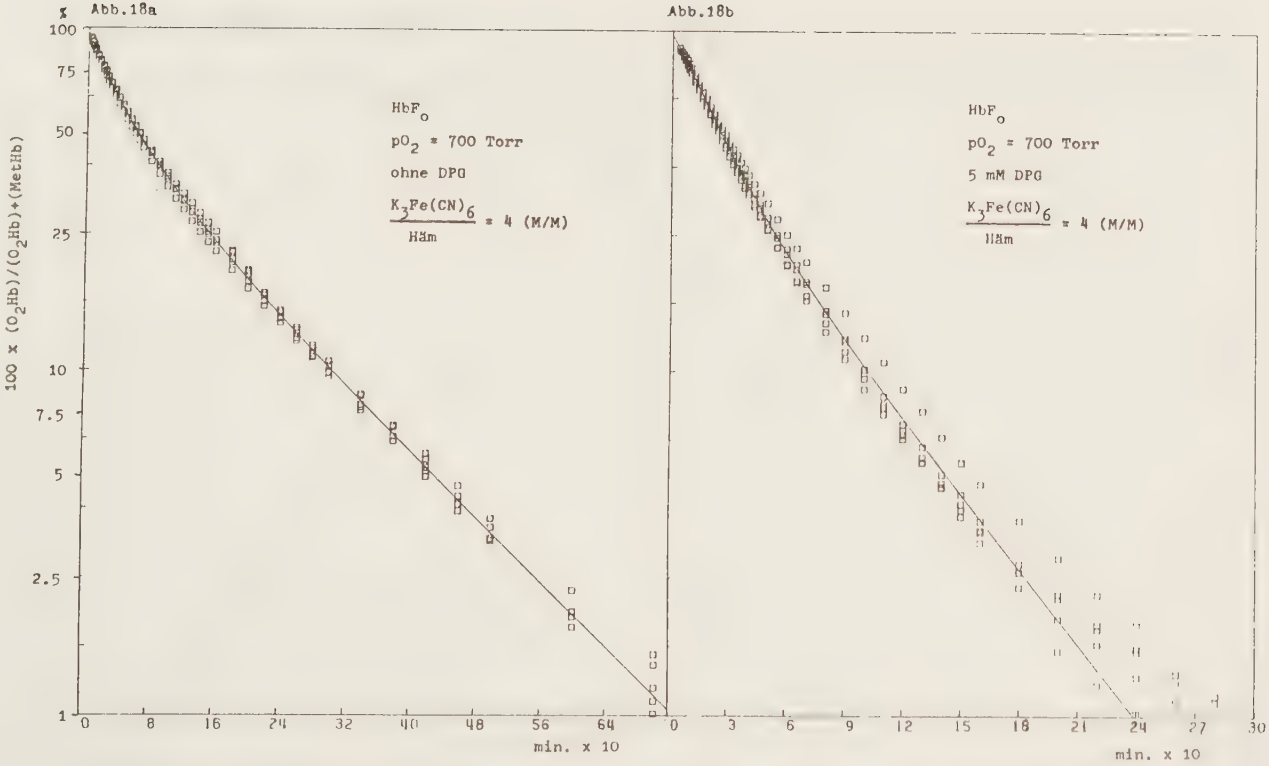
Darstellung der Einzelversuche und rechnerische Angleichung eines Reaktionsverlaufes an die beobachteten Punkte nach dem 4-Stufen-Modell (sh. S.40) mit den in Tabelle II angegebenen Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten k_1 - k_4 (durchgezogene Linie).

Sonstige Bedingungen auf Seite 95 . Gemittelte Kurven auf Seite 98.



Darstellung der Einzelversuche und rechnerische Angleichung eines Reaktionsverlaufes an die beobachteten Punkte nach dem 4-Stufen-Modell (sh S 40) mit den in Tabelle II angegebenen Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten k_1- k_4 (durchgezogene Linie).

Sonstige Bedingungen auf Seite 95. Gemittelte Kurve auf Seite 99.

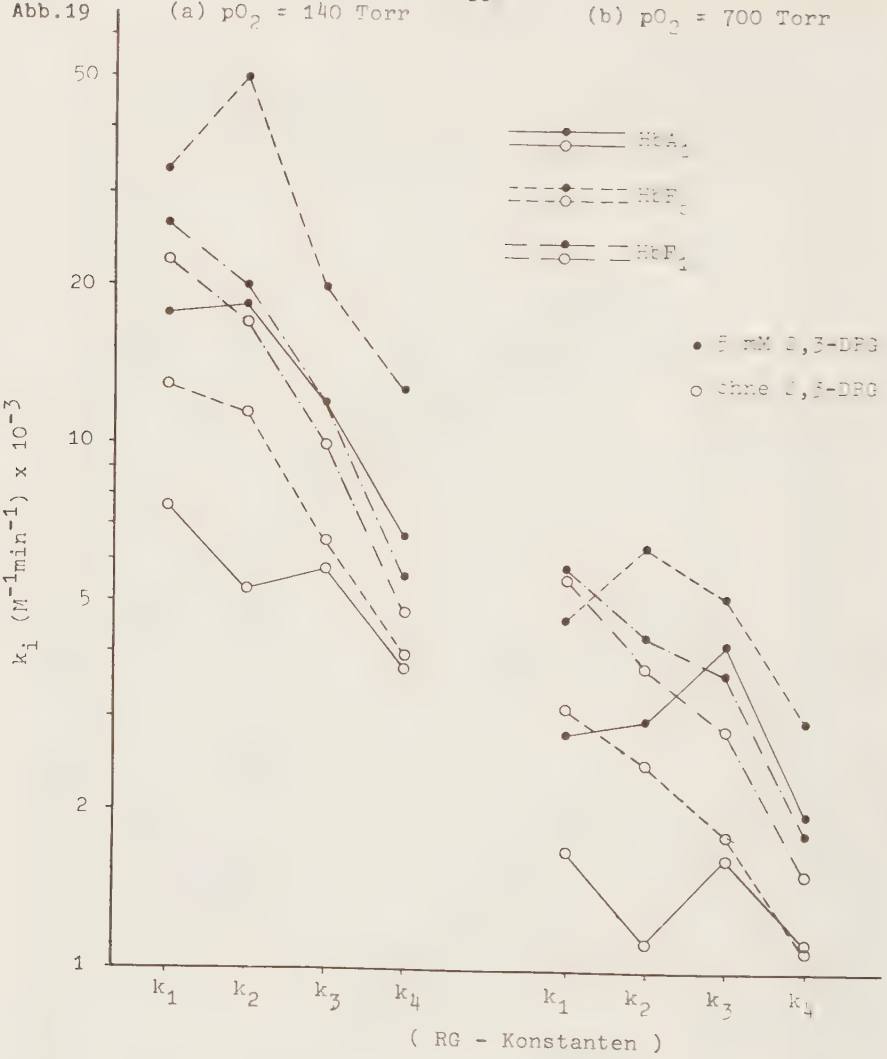


Darstellung der Einzelversuche und rechnerische Angleichung eines Reaktionsverlaufes an die beobachteten Punkte nach dem 4-Stufen-Modell (s.h. S. 40) mit den in Tabelle II angegebenen Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten k_1 - k_4 (durchgezogene Linie).

Sonstige Bedingungen auf Seite 95. Gemittelte Kurven auf Seite 100.

(1) In den Abbildungen 19 - 24 sind die Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten (RG-Konstanten) k_1 - k_4 der Übersichtlichkeit halber miteinander verbunden.

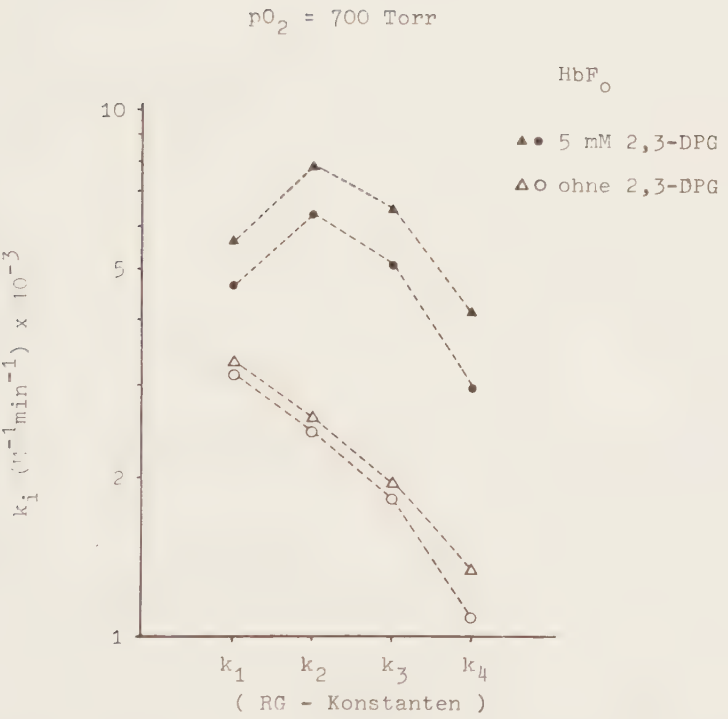
Abb.19



Darstellung[1] der individuellen Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten k_1- k_4 nach dem 4-Stufen-Modell unter Ausschluß einer Rückreaktion bei der Oxidation von HbA_1, HbF_o und HbF_1 durch Kaliumferricyanid in Gegenwart (•) und Abwesenheit (o) von 2,3-DPG bei pO_2 = 140 Torr (Abb.19a) und pO_2 = 700 Torr (Abb.19b).

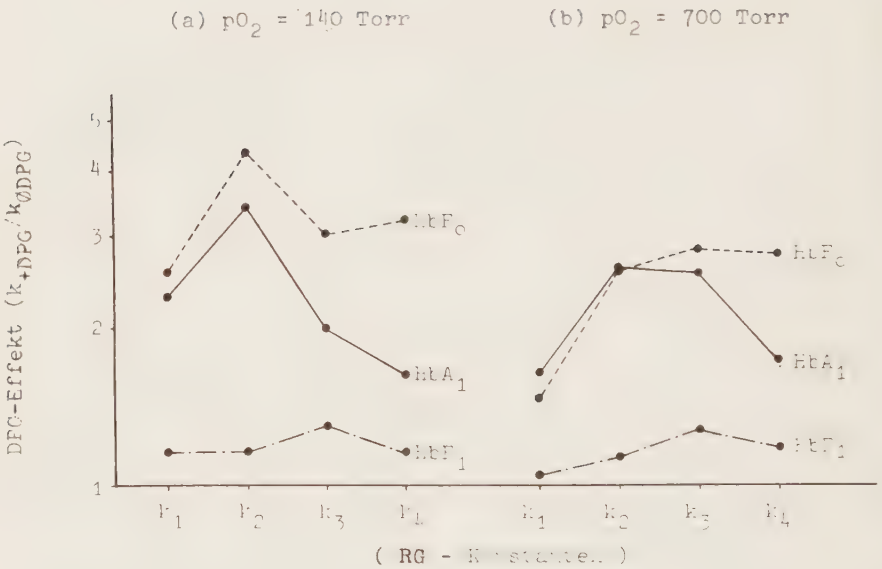
[1] s.h. Seite 115.

Abb.20



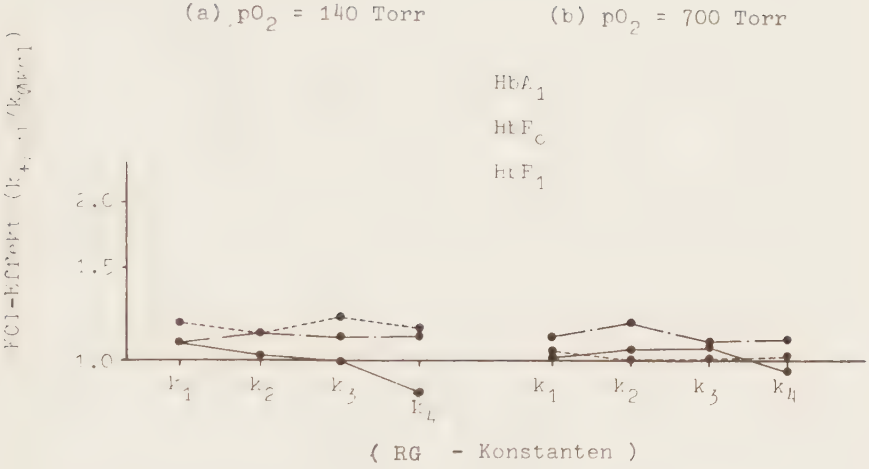
Vergleich[1] der individuellen Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten k_1- k_4 nach dem 4-Stufen-Modell unter Ausschluß einer Rückreaktion bei der Oxidation von HbF_o in Gegewart (●,▲) und in Abwesenheit (○,△) von 2,3-DPG und einem molaren Ferricyanid/Häm-Überschuß von 2,5 (●,○) und von 4,0 (▲,△). pO_2 = 700 Torr. Gesamt-Ionenstärke μ : 0,114 M (○), 0,149 M (●), 0,1149 M (△) und 0,1499 M (▲).

Abb. 21



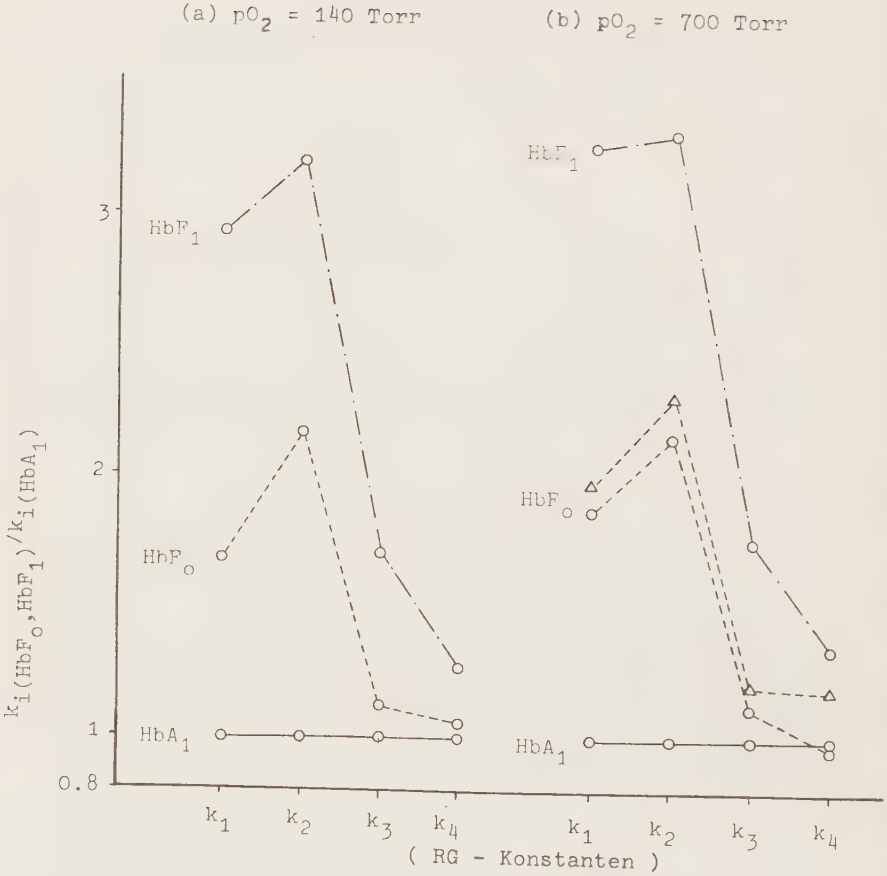
Darstellung[1] des Effektes von 2,3-DPG auf die individuellen Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten k_1- k_4 nach dem 4-Stufen-Modell (sh. S. 40) unter Ausschluß einer Rückreaktion ($k_{+DPG}/k_{\emptyset DPG}$) bei der Oxidation von HbA_1, HbF_o und HbF_1. Abb. **21a**: pO_2 = 140 Torr; Abb. **21b**: pO_2 = 700 Torr;

Abb. 22



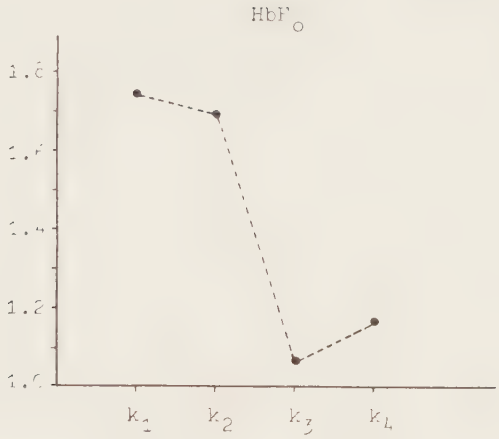
Darstellung[1] des Effektes von 35 mM KCl (entsprechend einer Ionenstärke von 5 mM 2,3-DPG u = 0,149 M auf die individuellen Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten k_1- k_4 nach dem 4-Stufen-Modell (sh.40) unter Ausschluß einer Rückreaktion ($k_{+KCl}/k_{ØKCl}$) bei der Oxidation von HbA_1, HbF_0 und HbF_1 durch Kaliumferricyanid. Abb.22a: pO_2 = 140 Torr; Abb.22b: pO_2 = 700 Torr;

Abb.23



Darstellung der relativen, individuellen RG-Konstanten k_1- k_4 nach dem 4-Stufen-Modell unter Ausschluß einer Rückreaktion bei der Oxidation von HbF_o und HbF_1 bezogen auf HbA_1 ($k_{i(HbF_o, HbF_1)}/k_{i(HbA_1)}$) in Abwesenheit von 2,3-DPG bei pO_2= 140 Torr (Abb.23a) und pO_2= 700 Torr (Abb.23b). Ferricyanid/Häm (M/M) = 2,5 (o), bzw. 4,0 (Δ).

Abb.24



(RG - Konstanten)

Darstellung[1] der Steigerung des 2,3-DPG-Effektes auf die Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten k_1 - k_4 der Ferricyanidoxidation von HbF_o durch die verminderte O_2-Konzentration bei pO_2 = 140 Torr gegenüber pO_2 = 700 Torr ($2,3\text{-DPG-Effekt}_{k_{i(Luft)}}$ / $2,3\text{-DPG-Effekt}_{k_{i(O_2)}}$). Werte aus Abb.21.

Tabelle I

Einfluß von 2,3-DPG auf die Kinetik der Hämoglobin-Oxidation durch Kaliumferricyanid

Mittelwerte ($\bar{x}$) und Standardabweichungen (S.D.) der Halbwertszeiten (t/2), die die Zeiten angeben, nach denen das Hämoglobin zu 50% in Methämoglobin umgewandelt ist. E = 2,3-DPG-Effekt auf die Halbwertszeiten ($t/2_{\varnothing DPG}/t/2_{+DPG}$).

Hb 10^{-4} M (HÄm) in 0,1 M TRAP pH 6,95 ± 0,015; Ferricyanid:Häm (M/M) = 2,5, bzw. 4,0 (*); 25 °C; gemessen bei 578 nm; Isolation der Hämoglobine über DEAE Sephadex A 50.

Bedingungen: O_2-Partialdruck (Torr)	Hb-Typ		2,3-DPG (mM)	KCl (mM)	n	$\bar{x}$ (Sek.)	S.D.	$\frac{t/2_{\varnothing DPG}}{t/2_{+DPG}}$ (E)	t/2 (Sek.)				
140	HbA_1		0	0	7	26.4	± 1.0		28.3 25.4	26.1 27.3	25.6	26.3	25.8
			0	35	4	25.3	± 1.1	1.04	26.8	24.4	25.3	24.7	
			5	0	7	10.1	± 0.9	2.61	11.1 9.2	9.6 10.4	11.3	10.0	9.0
	HbF_o		0	0	7	15.3	± 0.6		15.7 15.0	15.6 14.2	15.6	15.0	15.3
			0	35	7	13.0	± 0.4	1.18	13.6 12.5	13.2 13.3	12.7	12.5	13.1
			5	0	7	4.8	± 0.1	3.19	5.0 4.6	4.8 4.6	4.7	4.9	4.8
	HbF_1		0	0	5	9.7	± 0.5		9.0	9.7	9.7	10.0	10.3
			0	35	4	8.8	± 0.2	1.10	8.6	8.8	8.7	9.1	
			5	0	5	8.2	± 0.2	1.18	8.3	7.9	8.3	8.1	8.4
700	HbA_1		0	0	5	112.8	± 1.6		114.4	111.4	111.0	114.4	113.0
			0	35	3	109.1	± 2.8	1.03	107.0	108.0	112.2		
			5	0	8	52.8	± 0.8	2.14	53.3 53.5	52.8 52.8	52.8 51.0	53.6	52.7
	HbF_o		0	0	5	63.7	± 1.5		65.0	61.4	64.9	63.6	63.4
			0	35	2	61.7		1.03	60.7	62.7			
			5	0	7	30.7	± 0.4	2.07	31.1 30.3	30.2 30.4	30.4	31.1	31.1
		*	0	0	5	37.1	± 1.3		37.9	37.7	34.7	37.7	37.4
		*	5	0	5	15.4	± 0.7	2.41	14.5	15.7	15.5	15.1	16.4
	HbF_1		0	0	5	39.2	± 0.6		39.3	39.4	38.8	38.4	39.7
			0	35	3	34.6	± 2.0	1.13	34.8	32.5	36.5		
			5	0	5	33.9	± 1.3	1.16	34.8	34.5	34.7	33.6	31.7

Tabelle II

Einfluß von 2,3-DPG auf die Kinetik der Hämoglobin-Oxidation durch Kaliumferricyanid:

Individuelle Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten k_1- k_4 nach dem 4-Stufen-Modell unter Ausschluß einer Rückreaktion.

Hb 10^{-4} M (Häm) in 0,115 M TRAP pH 6,95 ± 0,015; 25 °C; Ferricyanid/Häm (M/M) = 2,5, bzw. 4,0 (*); gemessen bei 578 nm; Isolation der Hämoglobine über DEAE Sephadex A 50; n = Anzahl der Versuche; Berechnungen mit Hilfe des Fortran-Programm-Komplexes für non-linear-least-square fit (BGL.HLSF); unter den Konstanten sind deren Vertrauensbereiche angegeben (sh.3.4.3.).

Bedingungen					Konstanten			
O_2-Partialdruck (Torr)	Hb-Typ	2,3-DPG (mM)	KCl (mM)	n	k_1	k_2 ($M^{-1}min^{-1}$)	k_3	k_4
140	HbA_1	0	0	7	7.84 7.66- 8.01	5.44 5.17- 5.72	5.91 5.52- 6.30	3.84 3.71- 3.96
		0	35	4	8.46 8.10- 8.82	5.55 5.03- 5.08	5.89 5.16- 6.62	3.81 3.57- 4.06
		5	0	7	18.07 16.20-19.93	18.88 14.75-23.01	12.23 10.33-14.13	6.80 6.11- 7.49
	HbF_o	0	0	7	13.21 12.80-13.63	11.68 10.96-12.40	6.73 6.42- 7.14	4.04 3.90- 4.18
		0	35	7	15.75 15.31-16.20	13.23 12.52-13.95	8.13 7.79- 8.47	4.69 4.55- 4.83
		5	0	7	34.37 31.75-36.38	50.82 43.54-58.09	20.25 19.37-21.14	12.97 12.55-13.39
	HbF_1	0	0	5	22.97 21.93-24.01	17.41 16.10-18.72	9.32 8.82- 9.82	4.88 4.68- 5.08
		0	35	4	25.08 24.22-25.94	19.78 18.66-20.91	10.34 9.93-10.76	5.44 5.28- 5.59
		5	0	5	27.00 25.98-28.03	20.36 19.08-21.65	12.22 11.62-12.82	5.74 5.65- 6.03
700	HbA_1	0	0	5	1.74 1.70- 1.77	1.16 1.10- 1.23	1.68 1.54- 1.83	1.16 1.13- 1.20
		0	35	3	1.77 1.73- 1.82	1.22 1.12- 1.32	1.78 1.56- 2.01	1.10 1.06- 1.15
		5	0	8	2.89 2.83- 2.96	3.08 2.81- 3.26	4.30 3.89- 4.71	2.05 1.97- 2.06
	HbF_o	0	0	5	3.24 3.18- 3.31	2.53 2.43- 2.62	1.87 1.80- 1.94	1.12 1.09- 1.14
		0	35	2	3.38 3.28- 3.49	2.59 2.43- 2.74	1.88 1.77- 1.99	1.13 1.08- 1.18
		5	0	7	4.77 4.66- 4.88	6.50 6.08- 6.91	5.26 5.01- 5.50	3.07 2.99- 3.15
	*	0	0	5	3.45 3.34- 3.57	2.69 2.52- 2.87	2.01 1.87- 2.14	1.38 1.31- 1.44
	*	5	0	5	5.89 5.38- 6.40	8.16 6.37- 9.94	6.70 5.68- 7.73	4.26 3.95- 4.58
	HbF_1	0	0	5	5.67 5.57- 5.77	3.88 3.77- 3.98	2.93 2.85- 3.01	1.57 1.55- 1.60
		0	35	3	6.31 5.99- 6.64	4.55 4.12- 4.97	3.19 2.89- 3.49	2.72 1.61- 1.82
		5	0	5	5.97 5.78- 6.16	4.43 4.16- 4.70	3.77 3.53- 4.00	1.89 1.83- 1.95

[illegible 17].

[illegible] key to isomers for positive alignment (J_z-symmetric) and negative alignment (J_z-antisymmetric) of the [illegible] $(CH_3)_2$

[illegible] 10^{-6} M [illegible] in 0.1111 M [illegible] at 0.37 m [illegible] perchloric acid + 0.8 [illegible] 10^{-6} [illegible] and J_z-symmetric [illegible] [illegible] sulfoxide in [illegible] 10^{-3} M, [illegible] 10^{-3} M) in J_z-[illegible] [illegible], isolation and [illegible] [illegible] [illegible]; [illegible] of J_z and J_y [illegible] Table II.

[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]

Danksagung

Hiermit möchte ich allen, die mir bei der Erstellung dieser Arbeit geholfen haben, meinen Dank aussprechen:

Herrn Privatdozent Dr. med. Hans Th. Versmold für die Überlassung des interessanten Themas, die engagierte Betreuung und die nützlichen Ratschläge bei der Lösung experimenteller und redaktioneller Probleme;

Herrn Roland P. May für die Unterstützung bei der Durchführung der Berechnungen;

Herrn Professor Dr. med. Christian Bauer für die Unterstützung und die kritischen Anregungen;

Herrn Professor Dr. med. Kaspar Winterhalter für die hilfreiche Diskusion;

Herrn Professor Dr. rer. nat. Klaus Kühn (Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried)dafür, daß er die Durchführung der Berechnungen an einer Großrechenanlage ermöglichte;

Fräulein Heidi Windhorst für die praktische Anleitung zur Durchführung der Experimente;

der II.Frauenklinik der Universität München (Direktor : Professor Dr. med. Richter) für die Überlassung des Nabelschnurblutes;

sowie allen, die Blut gespendet haben.

Lebenslauf

Johann Mittermüller

Geboren am 24. Januar 1941 in Siegertsbrunn

Vater : Andreas Mittermüller
Mutter : Elisabeth Mittermüller, geborene Pfister

1947 - 1951	Besuch der Volksschule in Siegertsbrunn
1951 - 1957	Besuch des humanistischen Gymnasiums der Benediktiner in Kloster Schäftlarn
1957 - 1970	Besuch des humanistischen Gymnasiums der Benediktiner in Kloster Ettal, hier am
20.07.1970	Ablegung der Reifeprüfung
5.11.1970	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
4.10.1971	Ablegung der naturwissenschaftlichen Vorprüfung in München
3.04.1973	Ablegung der ärztlichen Vorprüfung
01.1974	Beginn der Arbeiten zu vorliegender Dissertation
17.12.1975	Ablegung des Staatsexamens in München
1.04.76 - 31.07.77	Medizinalassistent auf der chirurgischen Abteilung des Städtischen Krankenhauses in Überlingen/Bodensee

15.10.77 - 14.04.78	Medizinalassistent auf der Medizinischen Abteilung I des Städtischen Krankenhauses Rosenheim
15.04.78 - 14.06.78	Medizinalassistent auf der Abteilung I der Universitäts-Hautklinik in Tübingen
4.07.1978	Approbation als Arzt
seit 1.03.1979	Assistenzarzt der Medizinischen Klinik III des Klinikums Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität München